

TRAITE DE L'OPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année)
 21 juin 2000 (21.06.00)

Demande internationale no
 PCT/IB99/01719

Date du dépôt international (jour/mois/année)
 20 octobre 1999 (20.10.99)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
 MD/U04B3120

Date de priorité (jour/mois/année)
 20 octobre 1998 (20.10.98)

Déposant

CAROL, Pierre etc

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

22 mai 2000 (22.05.00)

dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection

 a été faite n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

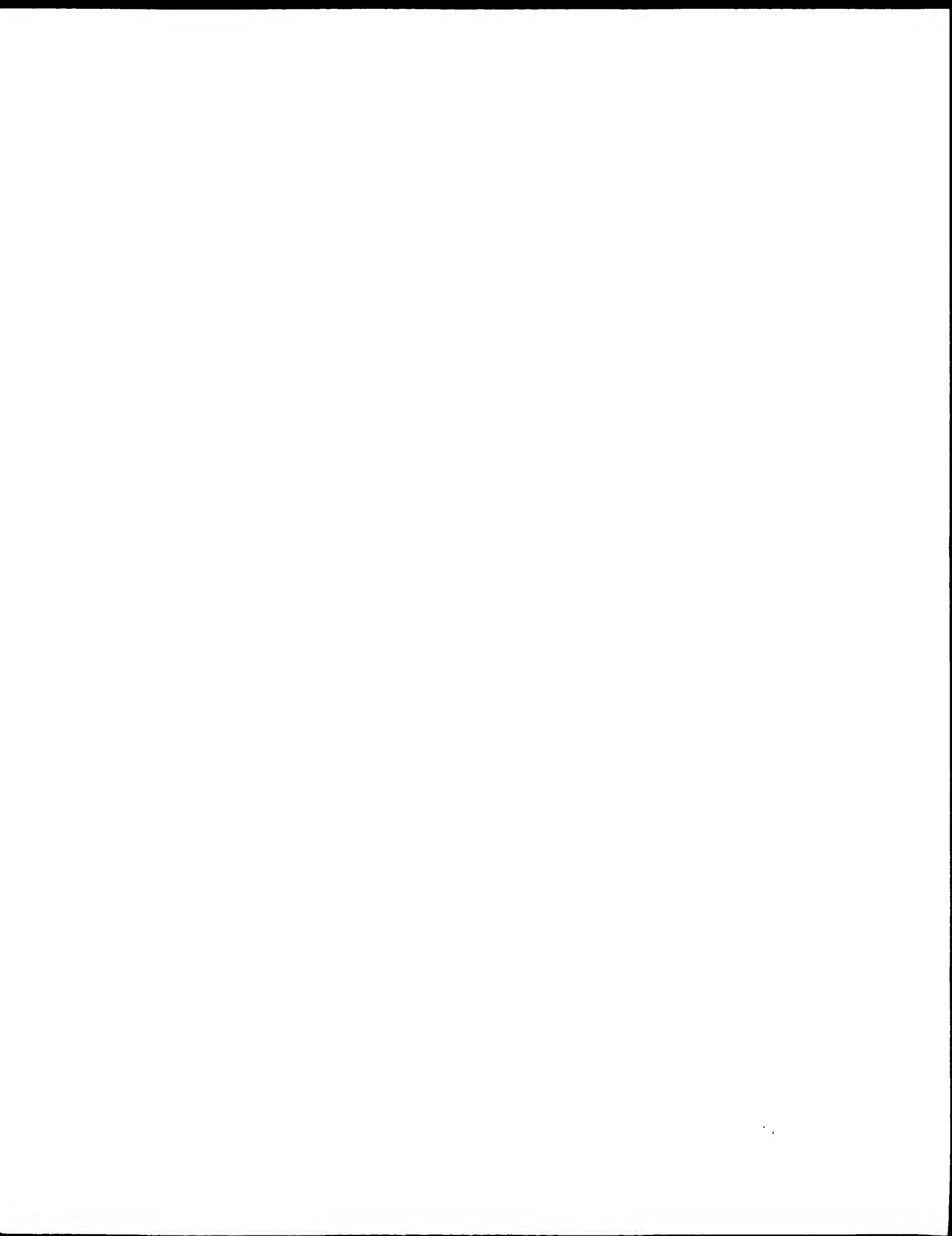
Bureau international de l'OMPI
 34, chemin des Colombettes
 1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Juan Cruz

no de téléphone: (41-22) 338.83.38



PCT**REQUEST**

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

International Application No. PCT/IB99/01719

International Filing Date October 20, 1999

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) MD/U04B3120**Box No. I TITLE OF INVENTION**

cDNA SEQUENCE TRANSCRIBING AN mRNA ENCODING THE TERMINAL OXIDASE ASSOCIATED WITH CAROTENOID BIOSYNTHESIS, AND USES THEREOF

Box No. II APPLICANT This person is also inventor

Name and address: (*Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.*)

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
BP 5338041 GRENOBLE CEDEX 9
FRANCE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (*Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.*)

CAROL Pierre
Universite Joesph FOURIER
Genetique Moleculaire des Plantes
CERMO BP 53X
38041 Grenoble Cedex
France

This person is:

 applicant only applicant and inventor inventor only (*If this check-box is marked, do not fill in below.*)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant for all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

 Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.**Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE**

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

 agent common representative

Name and address: (*Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.*)

CABINET GERMAIN & MAUREAU
BP 6153
69466 LYON CEDEX 06
FRANCE

Telephone No.

04 72 69 84 30

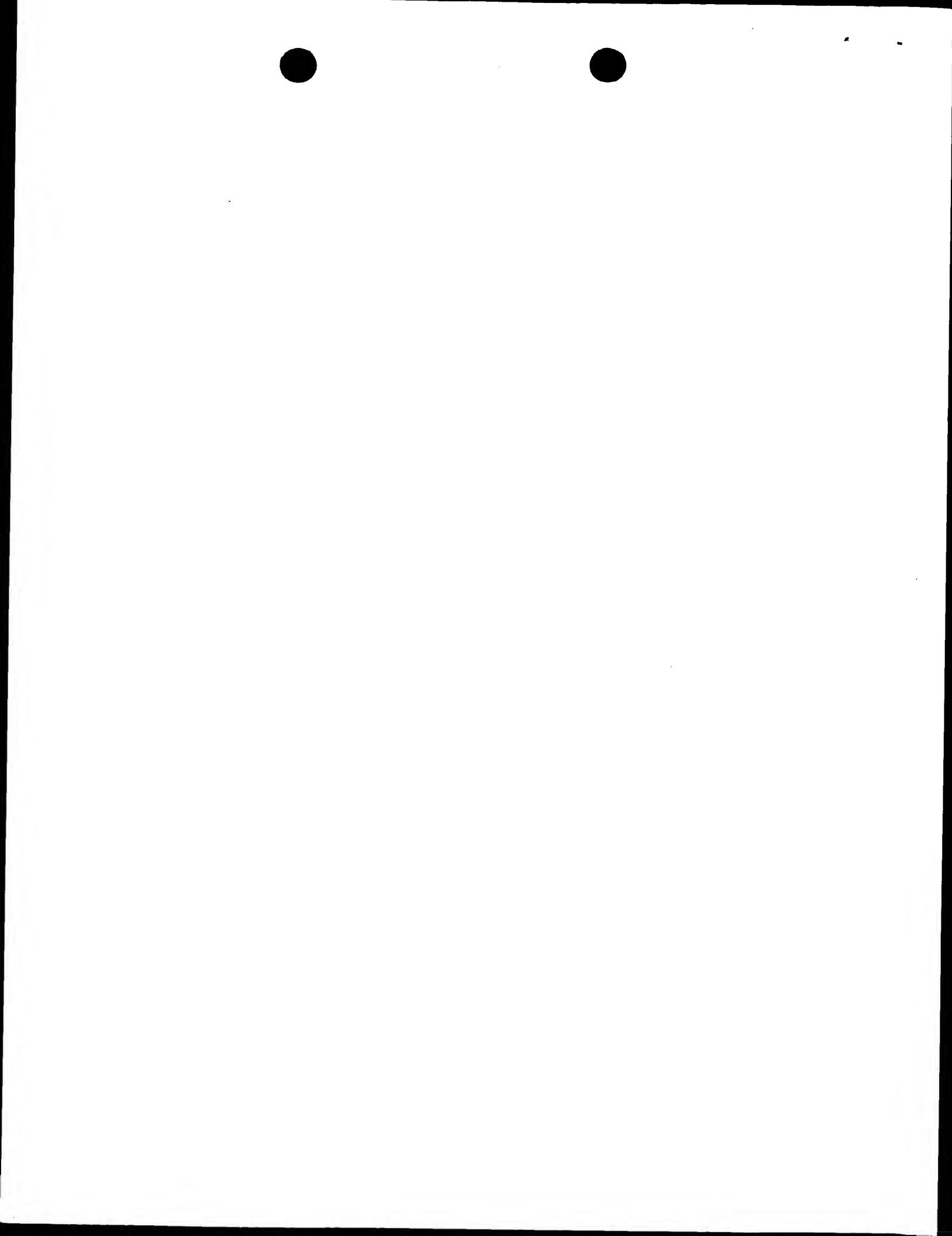
Facsimile No.

04 72 69 84 31

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.



Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)*If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.*

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

KUNTZ Marcel
 Universite Joseph FOURIER
 Genetique Moleculaire des Plantes
 CERMO BP 53X
 38041 GRENOBLE CEDEX
 FRANCE

This person is:

- applicant only
 applicant and inventor
 inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant for all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MACHE Regis
 Universite Joseph FOURIER
 Genetique Moleculaire des Plantes
 CERMO BP 53X
 38041 GRENOBLE CEDEX
 FRANCE

This person is:

- applicant only
 applicant and inventor
 inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant for all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- applicant only
 applicant and inventor
 inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

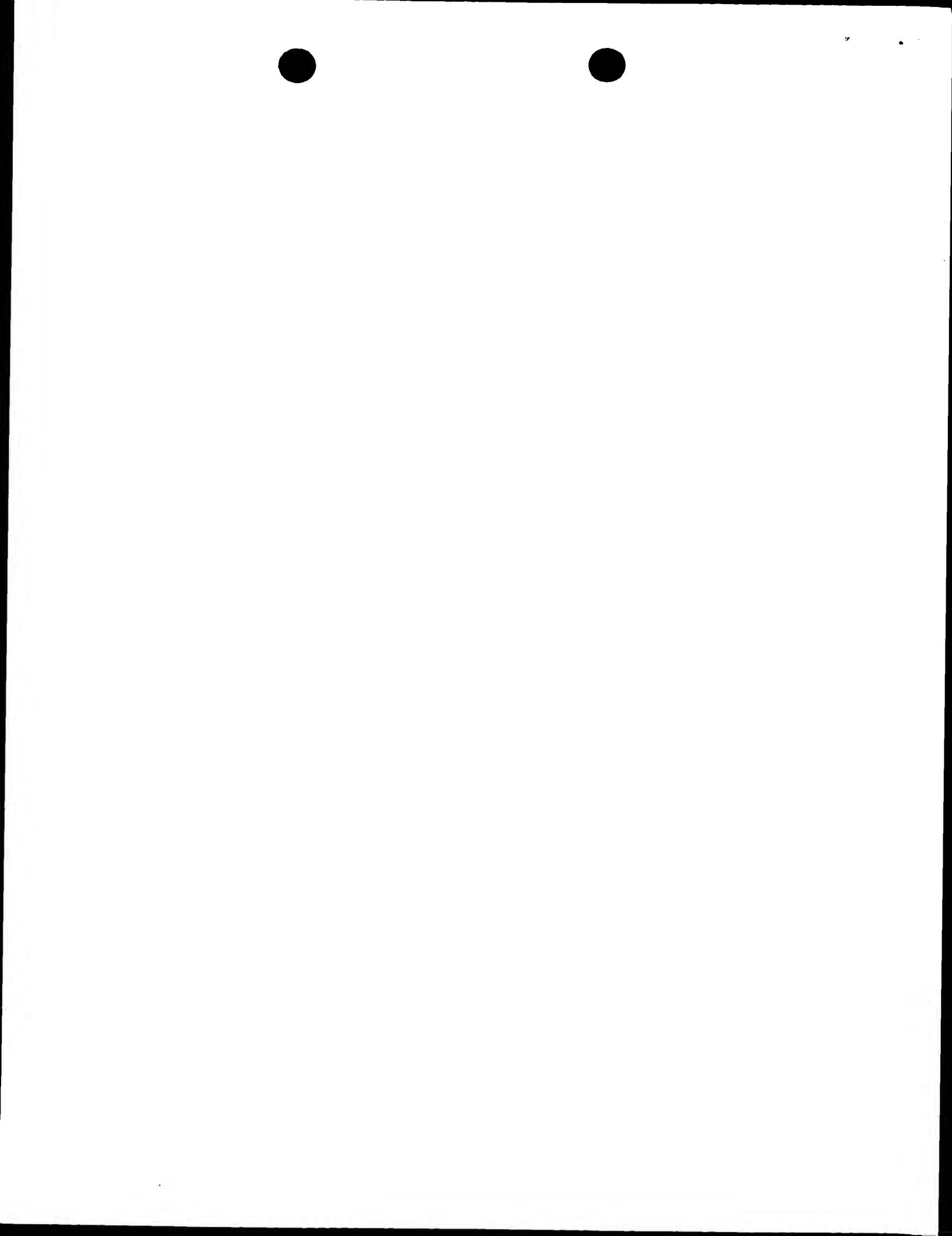
State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

See Notes to the request form



Box No. V DESIGNATION OF STATES*Mark the applicable check-boxes below; at least one must be marked.*The following designations are hereby made under Rule 4.9(a): (**Double-click here if you want all the boxes below checked.**)**Regional Patent**

- AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (*if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line*).....

National Patent (*if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line*):

<input type="checkbox"/> AE United Arab Emirates	<input type="checkbox"/> GE Georgia	<input type="checkbox"/> MW Malawi
<input type="checkbox"/> AG Antigua and Barbuda	<input type="checkbox"/> GH Ghana	<input type="checkbox"/> MX Mexico
<input type="checkbox"/> AL Albania	<input type="checkbox"/> GM Gambia	<input type="checkbox"/> MZ Mozambique
<input type="checkbox"/> AM Armenia	<input type="checkbox"/> HR Croatia	<input type="checkbox"/> NO Norway
<input type="checkbox"/> AT Austria	<input type="checkbox"/> HU Hungary	<input type="checkbox"/> NZ New Zealand
<input type="checkbox"/> AU Australia	<input type="checkbox"/> ID Indonesia	<input type="checkbox"/> PL Poland
<input type="checkbox"/> AZ Azerbaijan	<input checked="" type="checkbox"/> IL Israel	<input type="checkbox"/> PT Portugal
<input type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina	<input type="checkbox"/> IN India	<input type="checkbox"/> RO Romania
<input type="checkbox"/> BB Barbados	<input type="checkbox"/> IS Iceland	<input type="checkbox"/> RU Russian Federation
<input type="checkbox"/> BG Bulgaria	<input type="checkbox"/> JP Japan	<input type="checkbox"/> SD Sudan
<input type="checkbox"/> BR Brazil	<input type="checkbox"/> KE Kenya	<input type="checkbox"/> SE Sweden
<input type="checkbox"/> BY Belarus	<input type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan	<input type="checkbox"/> SG Singapore
<input type="checkbox"/> BZ Belize	<input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea	<input type="checkbox"/> SI Slovenia
<input checked="" type="checkbox"/> CA Canada	<input type="checkbox"/> KR Republic of Korea	<input type="checkbox"/> SK Slovakia
<input type="checkbox"/> CH & LI Switzerland and Liechtenstein	<input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan	<input type="checkbox"/> SL Sierra Leone
<input type="checkbox"/> CN China	<input type="checkbox"/> LC Saint Lucia	<input type="checkbox"/> TJ Tajikistan
<input type="checkbox"/> CO Colombia	<input type="checkbox"/> LK Sri Lanka	<input type="checkbox"/> TM Turkmenistan
<input type="checkbox"/> CR Costa Rica	<input type="checkbox"/> LR Liberia	<input type="checkbox"/> TR Turkey
<input type="checkbox"/> CU Cuba	<input type="checkbox"/> LS Lesotho	<input type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago
<input type="checkbox"/> CZ Czech Republic	<input type="checkbox"/> LT Lithuania	<input type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania
<input type="checkbox"/> DE Germany	<input type="checkbox"/> LU Luxembourg	<input type="checkbox"/> UA Ukraine
<input type="checkbox"/> DK Denmark	<input type="checkbox"/> LV Latvia	<input type="checkbox"/> UG Uganda
<input type="checkbox"/> DM Dominica	<input type="checkbox"/> MA Morocco	<input checked="" type="checkbox"/> US United States of America
<input type="checkbox"/> DZ Algeria	<input type="checkbox"/> MD Republic of Moldova	<input type="checkbox"/> UZ Uzbekistan
<input type="checkbox"/> EE Estonia	<input type="checkbox"/> MG Madagascar	<input type="checkbox"/> VN Viet Nam
<input type="checkbox"/> ES Spain	<input type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia	<input type="checkbox"/> YU Yugoslavia
<input type="checkbox"/> FI Finland	<input type="checkbox"/> MN Mongolia	<input type="checkbox"/> ZA South Africa
<input type="checkbox"/> GB United Kingdom		<input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe
<input type="checkbox"/> GD Grenada		

Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except the designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (*Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.*)



Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application:*	international application: receiving Office
item (1) 20 October 1998	98.13283	FRANCE		
item (2)				
item (3)				
item (4)				
item (5)				

Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (*only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office*) identified above as:

all items item (1) item (2) item (3) item (4) item (5) other, see
Supplemental
Box

*Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA /EP.....

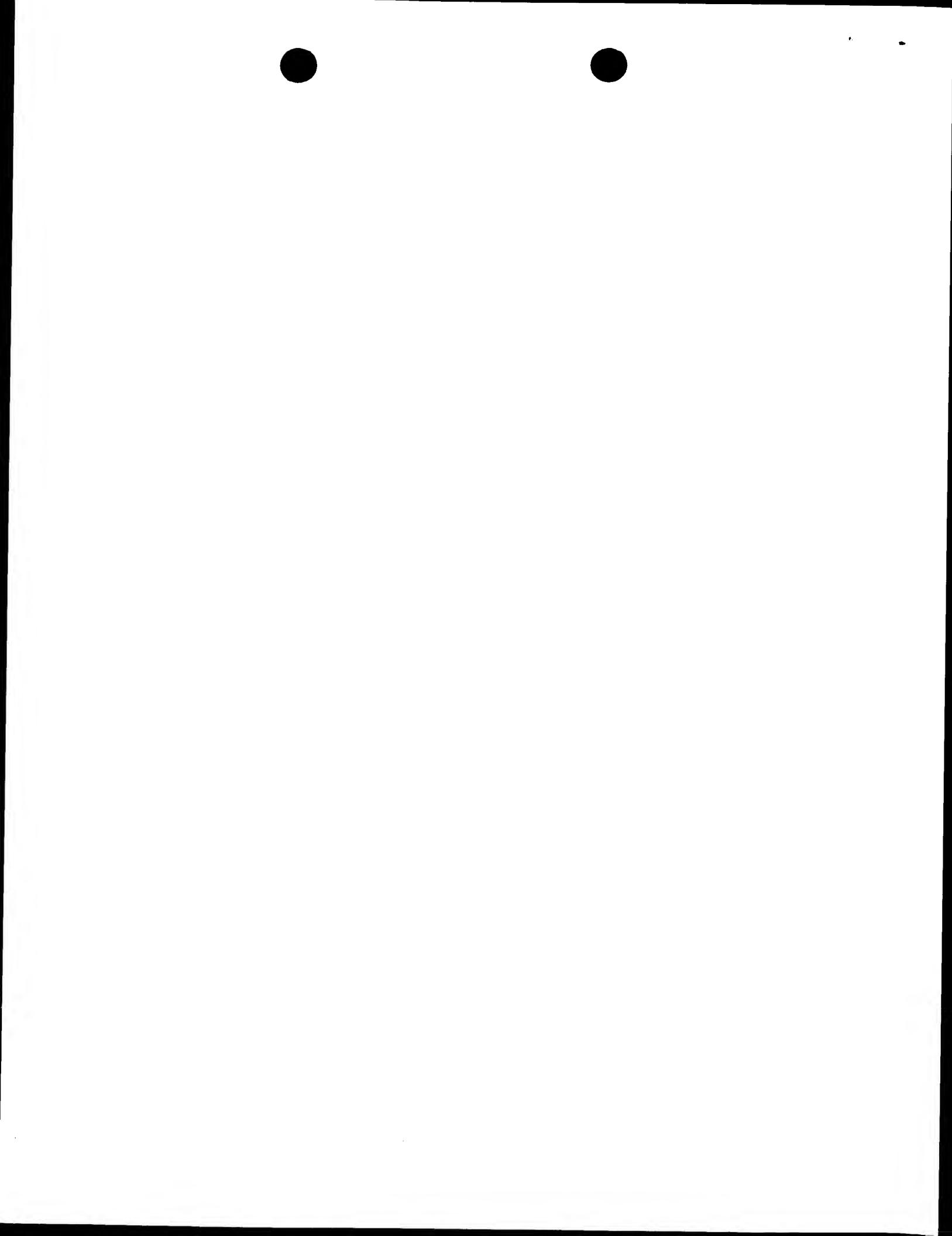
Request to use results of earlier search: reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year)	Number	Country (or regional Office)
29 July 1999	FA 565157	FRANCE

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

- | | | Number of declarations |
|---|--|------------------------|
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (i) | Declaration as to the identify of the inventor | : |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (ii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent | : |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (iii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application | : |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (iv) | Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) | : |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (v) | Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty: | : |



Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:	This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):		Number of items
(a) the following number of sheets in paper form:			
request (including declaration sheets) : 04	<input type="checkbox"/>	fee calculation sheet	:
description (excluding sequence listing part) : 28	<input type="checkbox"/>	original separate power of attorney	:
claims : 04	<input type="checkbox"/>	original general power of attorney	:
abstract : 01	<input type="checkbox"/>	copy of general power of attorney; reference number, if any:.....	:
drawings : 05	<input type="checkbox"/>	statement explaining lack of signature	:
Sub-total number of sheets :			
sequence listing part of description (actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (b) below) : 06	<input type="checkbox"/>	priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):.....	:
Total number of sheets : 48	<input type="checkbox"/>	translation of international application into (language):.....	:
(b) sequence listing part of description filed in computer readable form			
(i) <input type="checkbox"/> only (under Section 801(a)(i))	<input type="checkbox"/>	separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:
(ii) <input type="checkbox"/> in addition to being filed in paper form (under Section 801(a)(ii))	<input type="checkbox"/>	sequence listing in computer readable form (indicate also type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other))	:
Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which the sequence listing part is contained (additional copies to be indicated under item 9(ii), in right column):	<input type="checkbox"/>	copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)	:
	<input type="checkbox"/>	(only where check-box (b)(i) or (b)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	:
	<input type="checkbox"/>	together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part mentioned in left column	:
	<input type="checkbox"/>	other (specify)	:
Figure of the drawings which should accompany the abstract: 1	Language of filing of the international application: FRENCH		

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

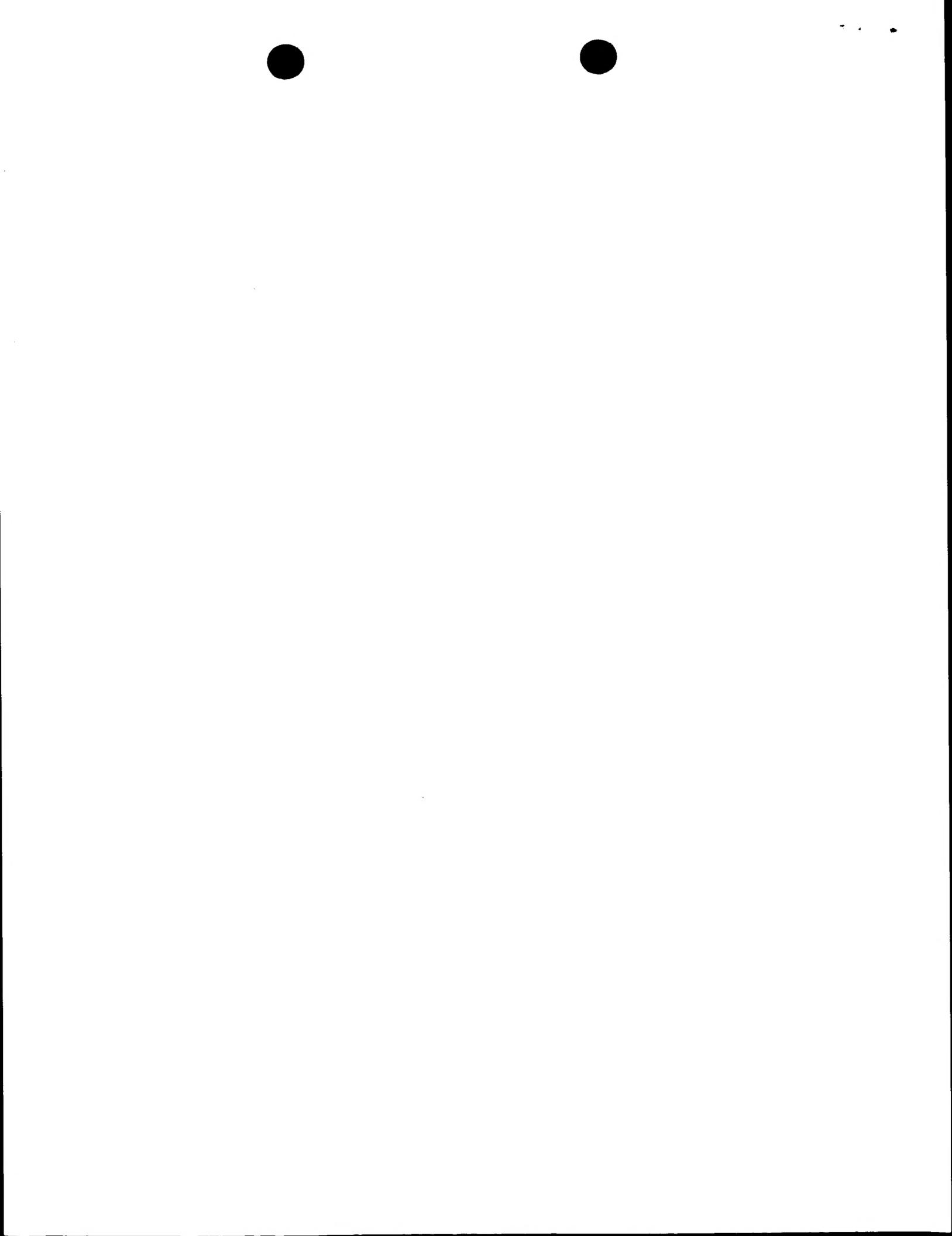
CABINET GERMAIN & MAUREAU
Mireille DIDIER
LYON/FRANCE, 20 October 1999

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings:	
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	<input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. <input type="checkbox"/>	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau:



Translation
09/801861

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1600/290
NOV 09 2001

RECEIVED

Applicant's or agent's file reference MD/U04B3120	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/IB99/01719	International filing date (day/month/year) 20 October 1999 (20.10.99)	Priority date (day/month/year) 20 October 1998 (20.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82, 9/02, 5/10, G01N 33/50, A01H 5/00		
Applicant UNIVERSITE JOSEPH FOURIER		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

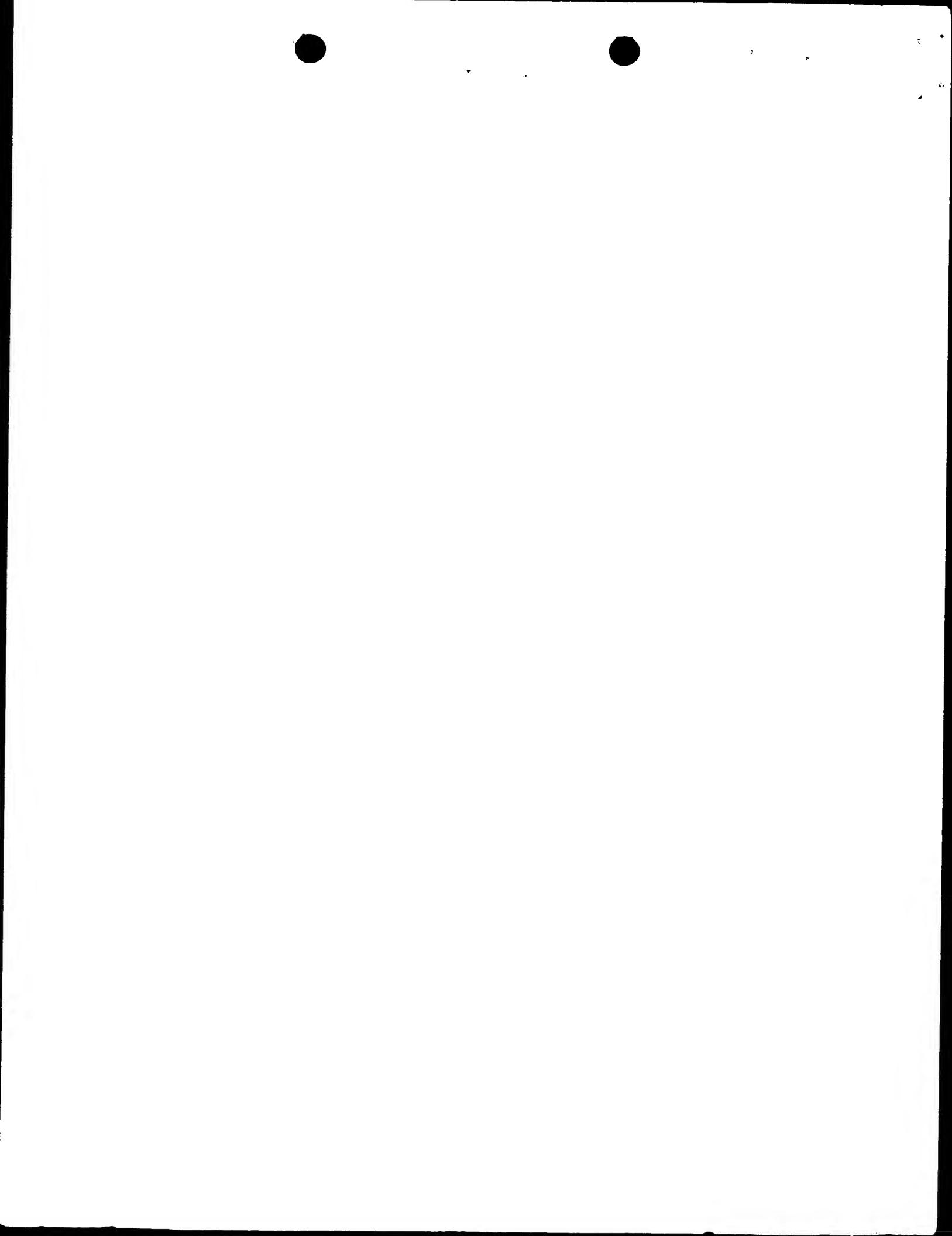
This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 22 May 2000 (22.05.00)	Date of completion of this report 26 January 2001 (26.01.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/IB99/01719

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages _____ 1-33 _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____ 1-16 _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19) _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages _____ 1/5-5/5 _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____ 1-6 _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

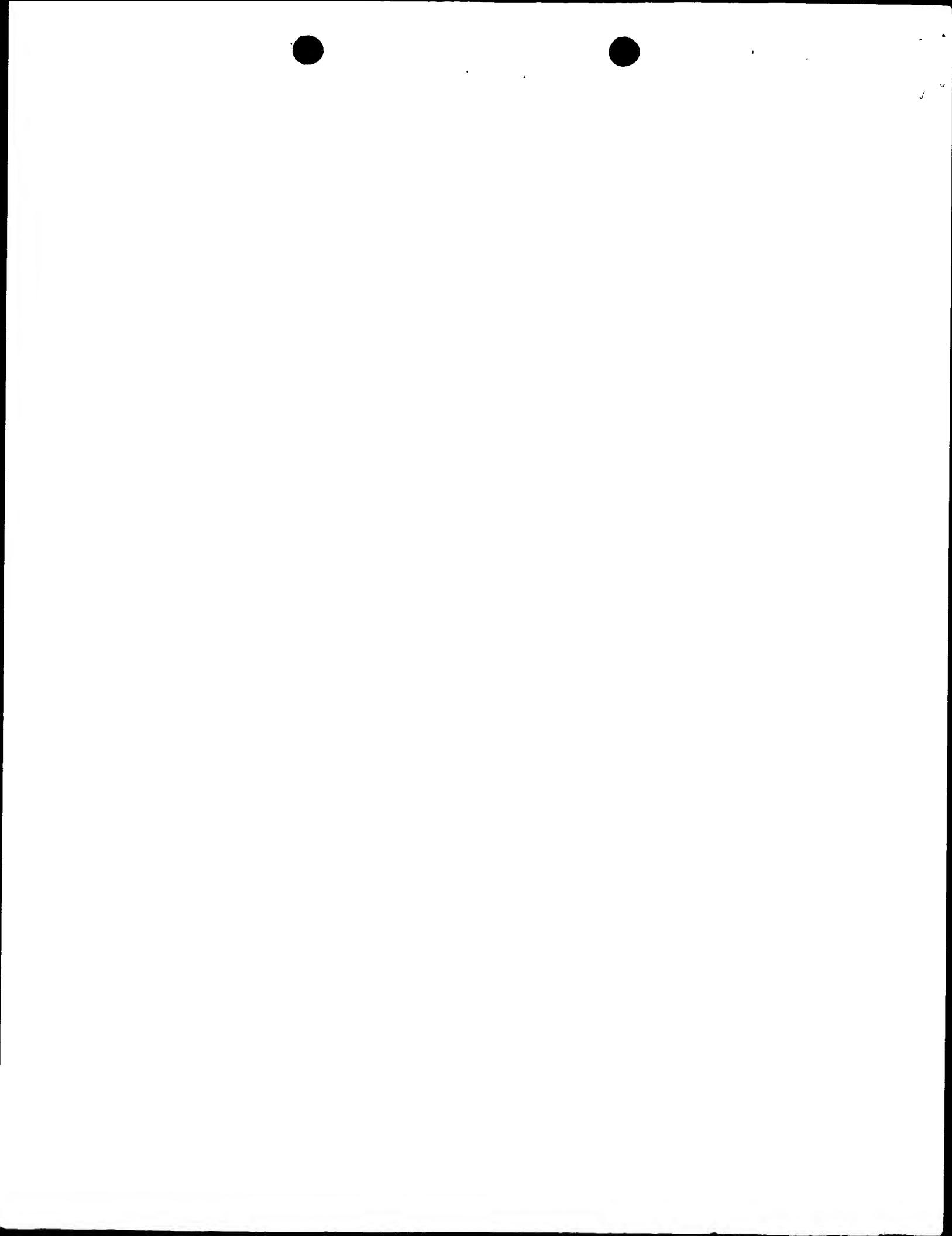
2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language: _____ which is: the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/IB99/01719

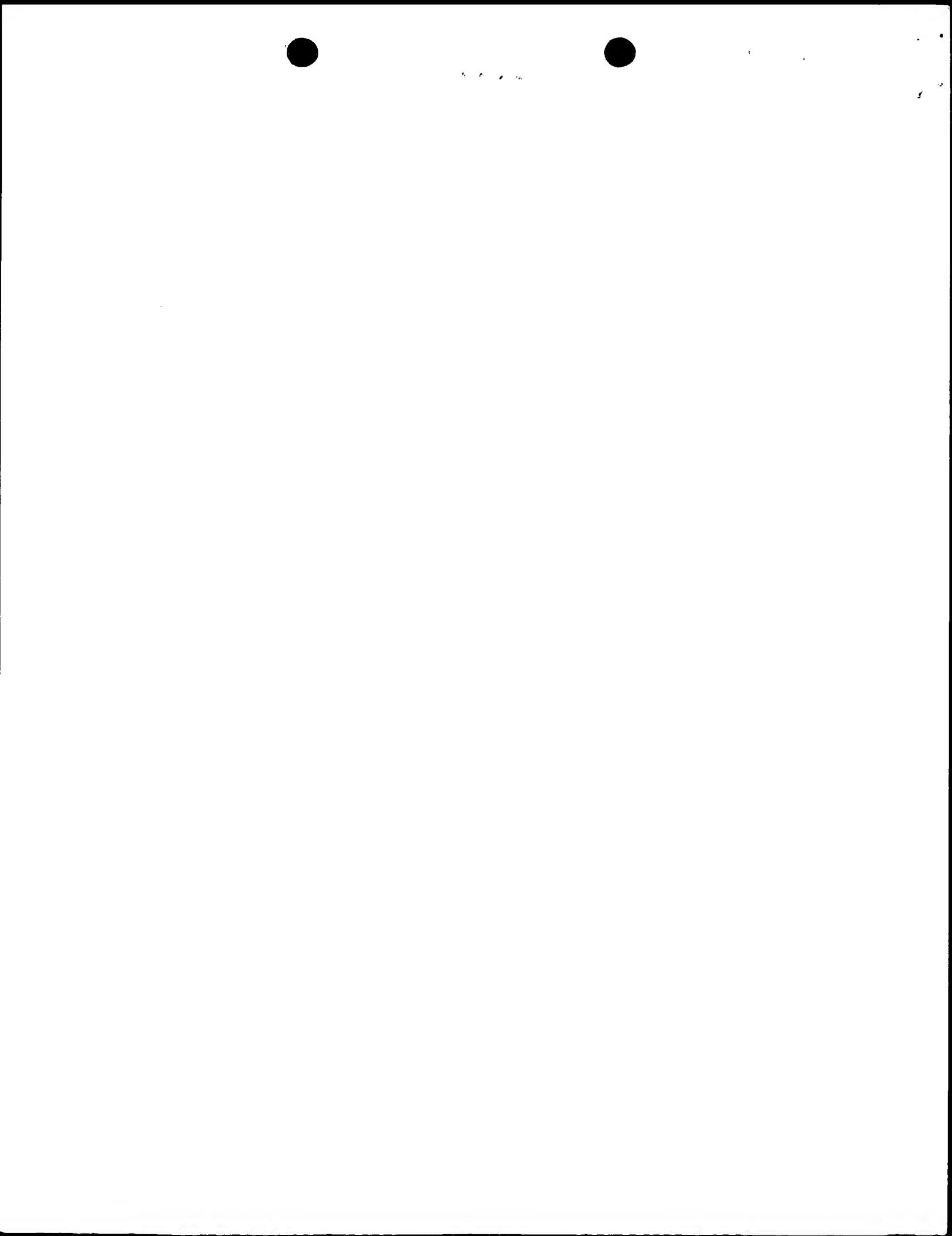
II. Priority

1. This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
 - copy of the earlier application whose priority has been claimed.
 - translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

See Supplemental Sheet



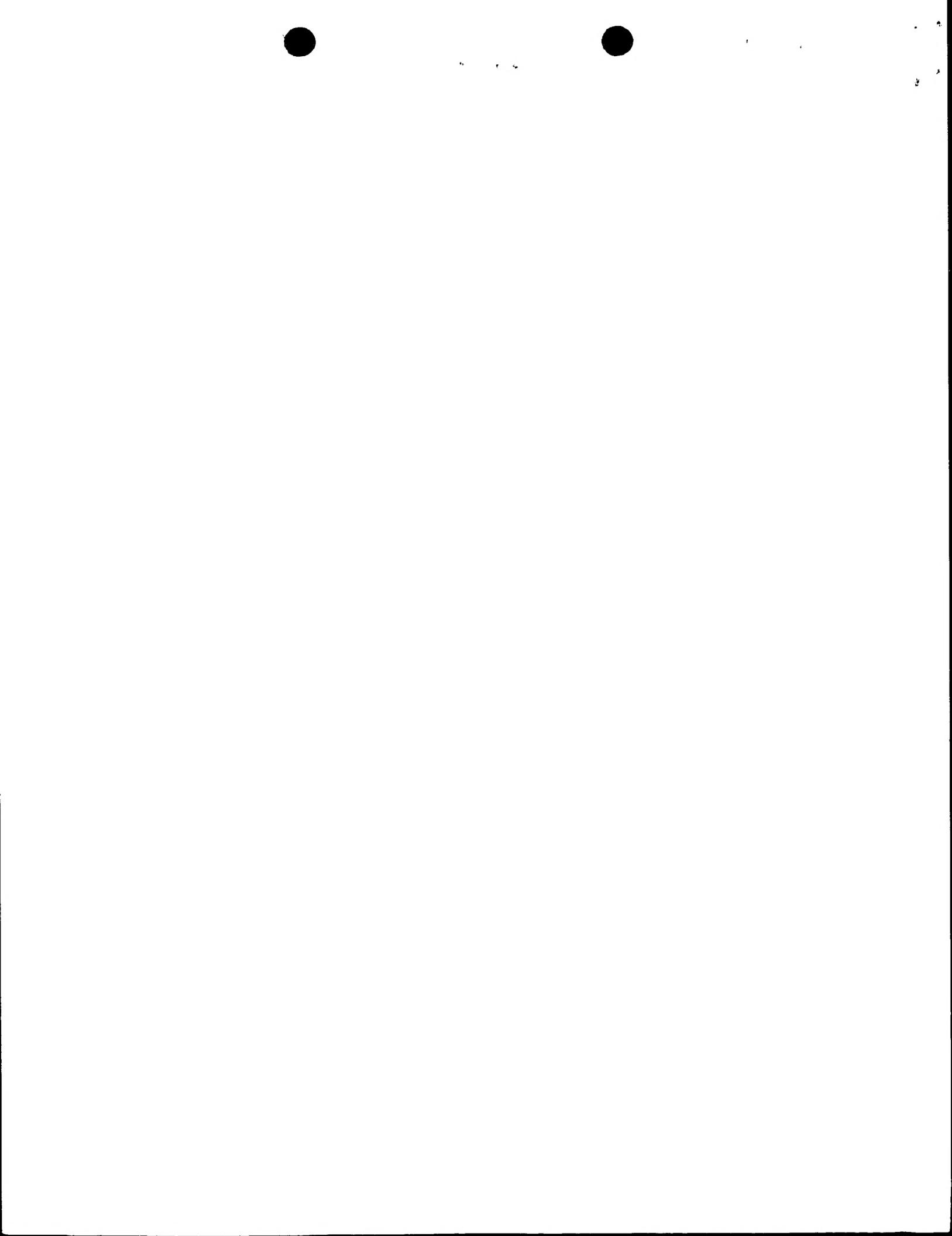
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/IB 99/01719**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of II.

The subject matter of the present application, relating to a method for selecting herbicidal compounds and involving contacting cells or cell membranes according to Claim 12 with said agent (Claim 16) is absent from the priority document since it has been introduced for the first time on the filing date of the present application. The priority claimed is therefore not valid for said subject matter.

The following documents have been cited as P documents:
PLANT CELL, Vol.11, January 1999, pages 57-68, Carol et al. 'Mutations in the *Arabidopsis* gene *IMMUTANS* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation'
PLANT CELL, Vol.11, January 1999, pages 43-55, Wu et al. 'The *IMMUTANS* variegation locus of *Arabidopsis* defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis'.
However, the documents in question neither describe nor suggest such a method: they have not therefore been used to establish the present opinion.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/IB 99/01719

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

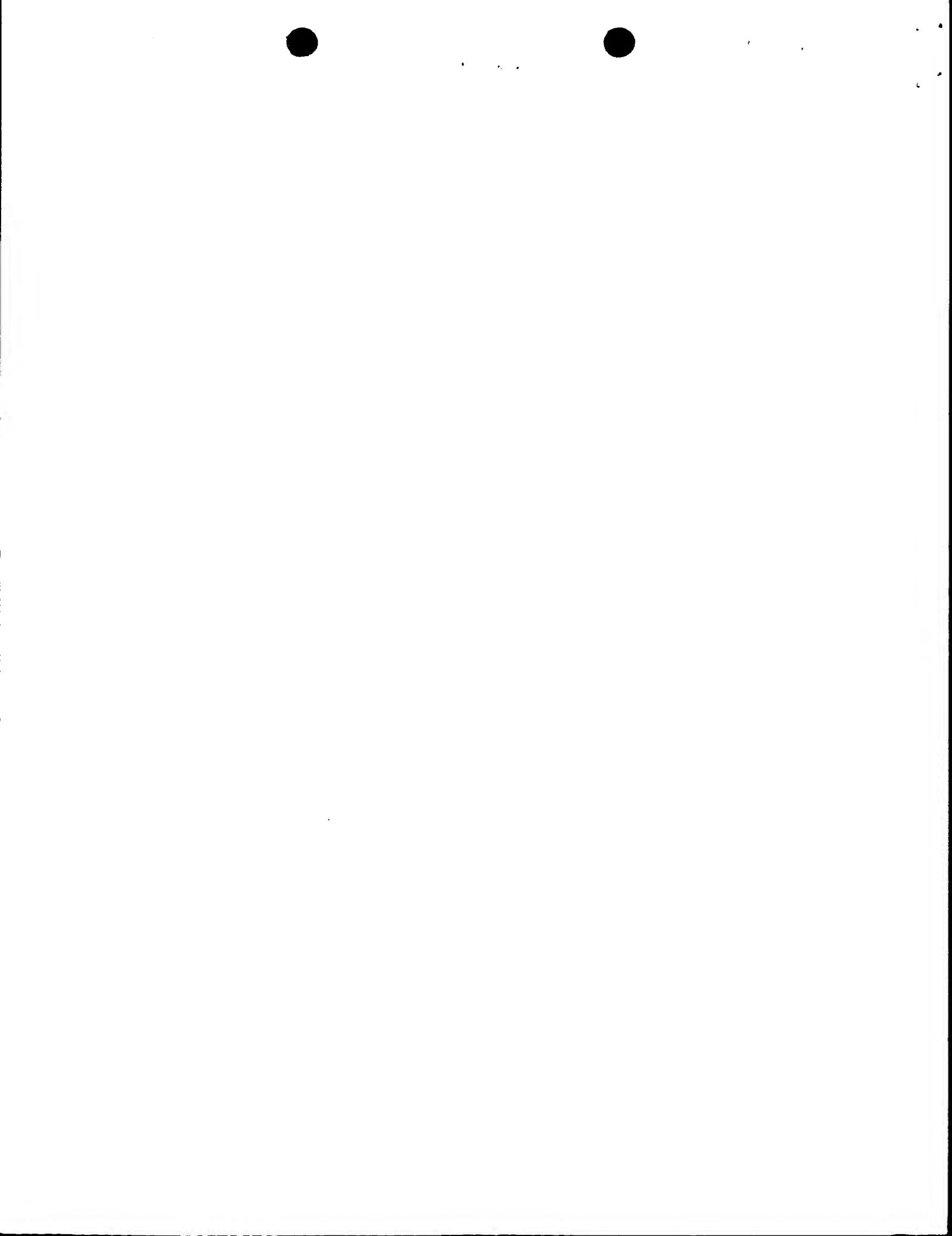
Novelty (N)	Claims	1, 3, 5-16	YES
	Claims	2, 4	NO
Inventive step (IS)	Claims	1, 3, 5-16	YES
	Claims	2, 4	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

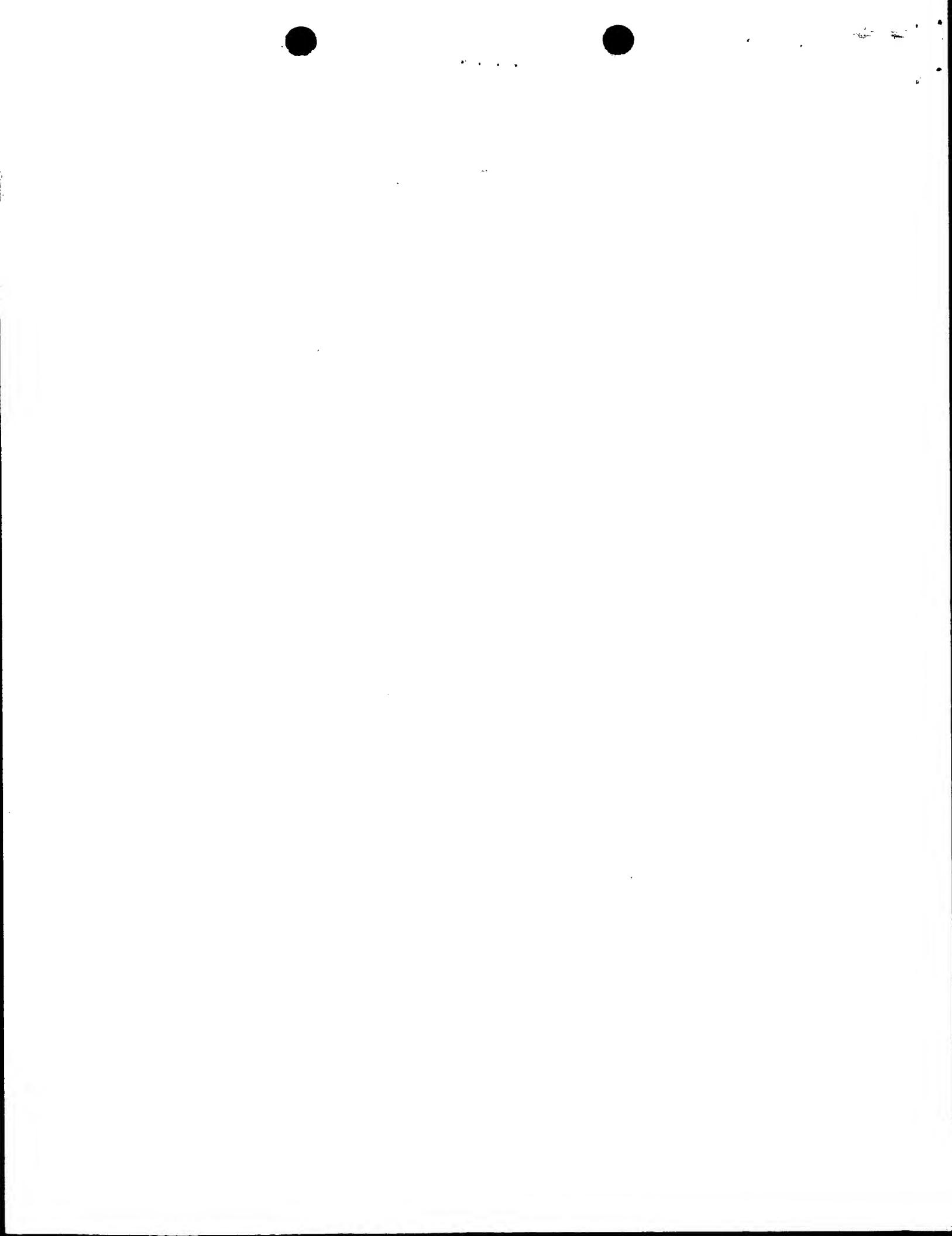
- D1: Newman et al. 'Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones' EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 3 February 1995
- D2: Bevan et al. '*Arabidopsis thaliana* chromosome 4, BAC clone T10/14' EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 3 February 1998

1. D1 and D2 implicitly describe the antisense sequences of **Claims 2 and 4**. As a consequence, the subject matter of **Claims 2 and 4** does not meet the requirement of novelty of PCT Article 33(2).
2. The other claims meet the requirement of novelty of PCT Article 33(2) and the requirement of inventive step of PCT Article 33(3).
3. There may be doubts as to the usefulness (that is to say, industrial applicability) of the complex of **Claim 6** (PCT Article 33(4)). In particular, the way in which said complex contributes to solving the technical problem underlying the present application



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/IB 99/01719

is unclear (PCT Article 5), even if it is obvious that such a complex must be obtained *in vivo* between native mRNAs and antisense RNAs resulting from the expression of an exogenous nucleic acid in order to inhibit the expression of the TOBC protein. In any case, nothing in the present application indicates for what end the production of such a complex would be industrially necessary.



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire MD/U04B3120	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/IB 99/01719	Date du dépôt international (<i>jour/mois/année</i>) 20/10/1999	(Date de priorité (la plus ancienne) (<i>jour/mois/année</i>)) 20/10/1998
Déposant UNIVERSITE JOSEPH FOURIER et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau International.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuillets.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
 - la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
 - contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
 - déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
 - La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

- le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abréviation,

- le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abréviation est la Figure n°

- suggérée par le déposant.
- parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

1

Aucune des figures n'est à publier.



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT 99/01719

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/82 C12N9/02

C12N5/10

G01N33/50

A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N G01N A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WETZEL, C.M., ET AL.: "nuclear-organelle interactions: the immutans variegation mutant of <i>Arabidopsis</i> is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis" <i>THE PLANT JOURNAL</i>, vol. 6, no. 2, 1994, pages 161-175, XP002110646 cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">—</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,3

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 février 2000

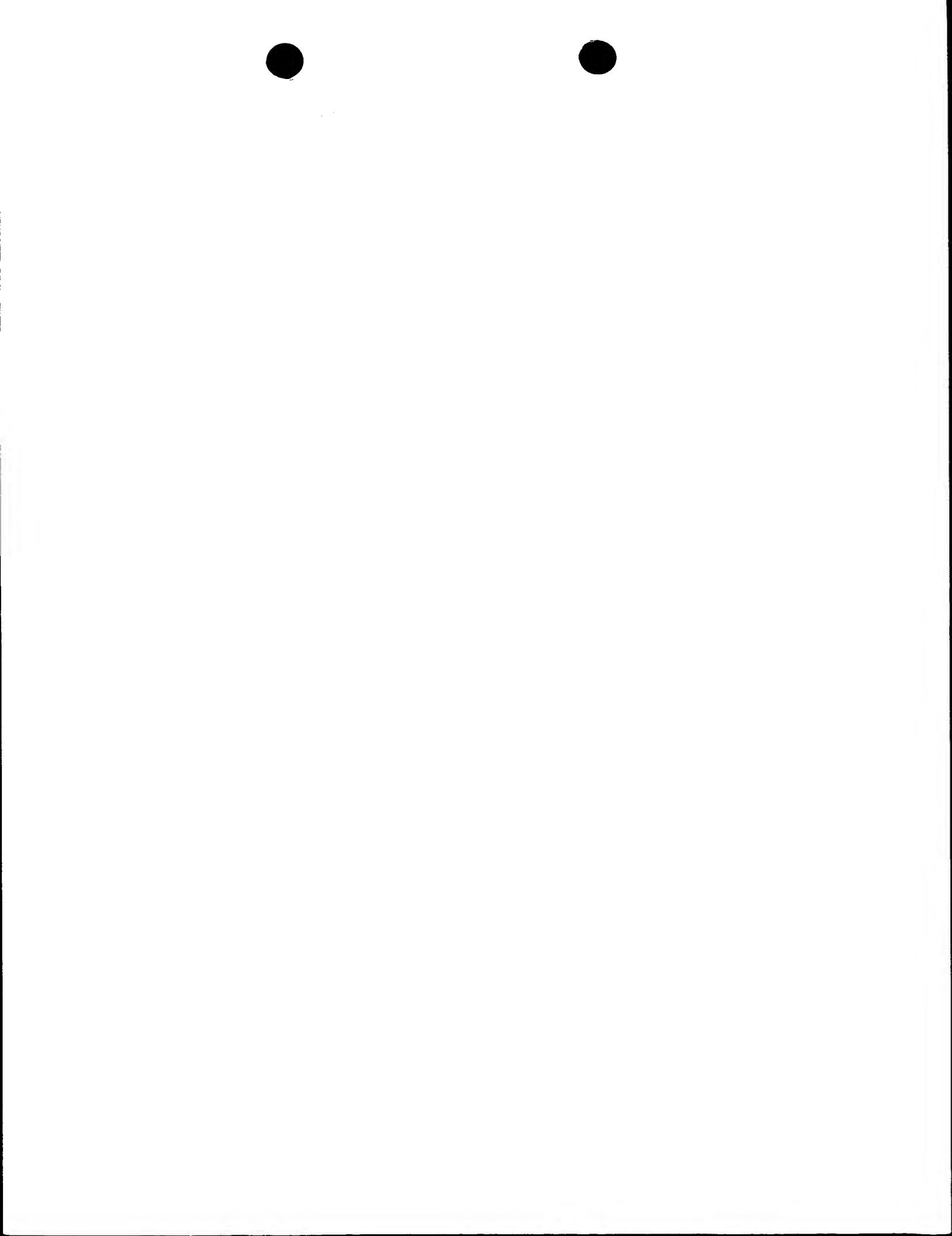
Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/03/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Holtorf, S



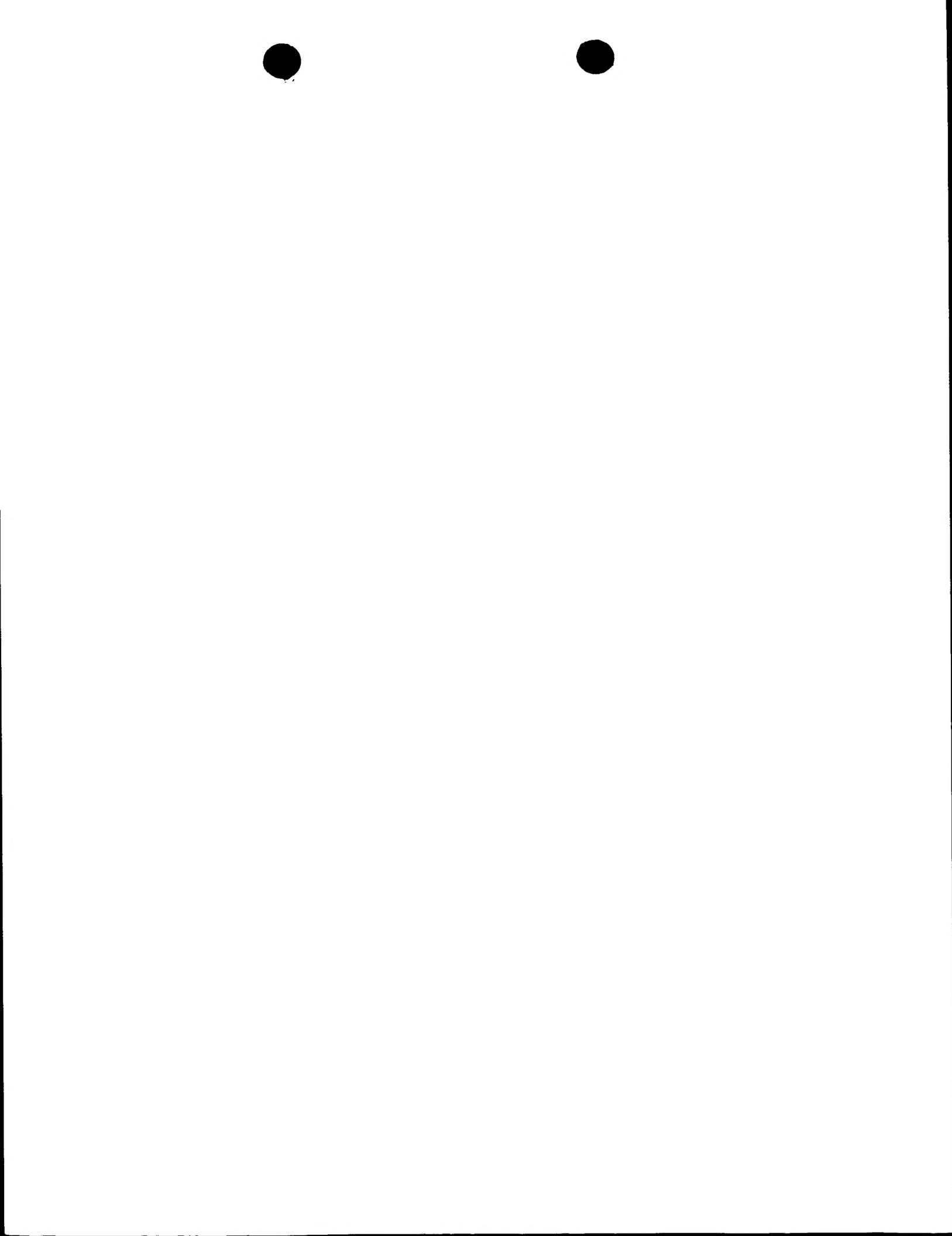
RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT 99/01719

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents ciblés, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	NEWMAN, T., ET AL.: "Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous <i>Arabidopsis</i> cDNA clones" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 3 février 1995 (1995-02-03), XP002110647 heidelberg, germany accession no. T42793 ---	1
X	BEVAN, M., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome 4, BAC clone T10I14" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 3 février 1998 (1998-02-03), XP002110648 accession no. AL021712 ---	2,4
A	BEVAN, M., ET AL.: "hypothetical 38.7 KD protein" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 1 juin 1998 (1998-06-01), XP002110649 heidelberg, germany accession no. 049631 ---	1-15
A	FINNEGAN, P.M., ET AL.: "untitled" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 15 juillet 1998 (1998-07-15), XP002110650 heidelberg, germany accession no. 003376 ---	1-15
A	WO 95 34668 A (BIOSOURCE TECH INC) 21 décembre 1995 (1995-12-21) abstract; pages 3,5,4 1e document en entier ---	1-15
A	WO 91 09128 A (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 27 juin 1991 (1991-06-27) pages 1,6; examples; revendications ---	1-15
A	FINNEGAN, P.M., ET AL. : "differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 114, no. 2, juin 1997 (1997-06), pages 455-466, XP002131002 1e document en entier ---	1-15
P,X	CAROL, P., ET AL.: "mutations in the <i>Arabidopsis</i> gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with Phytoene desaturation" THE PLANT CELL, vol. 11, janvier 1999 (1999-01), pages 57-68, XP002110651 1e document en entier ---	1-3,5



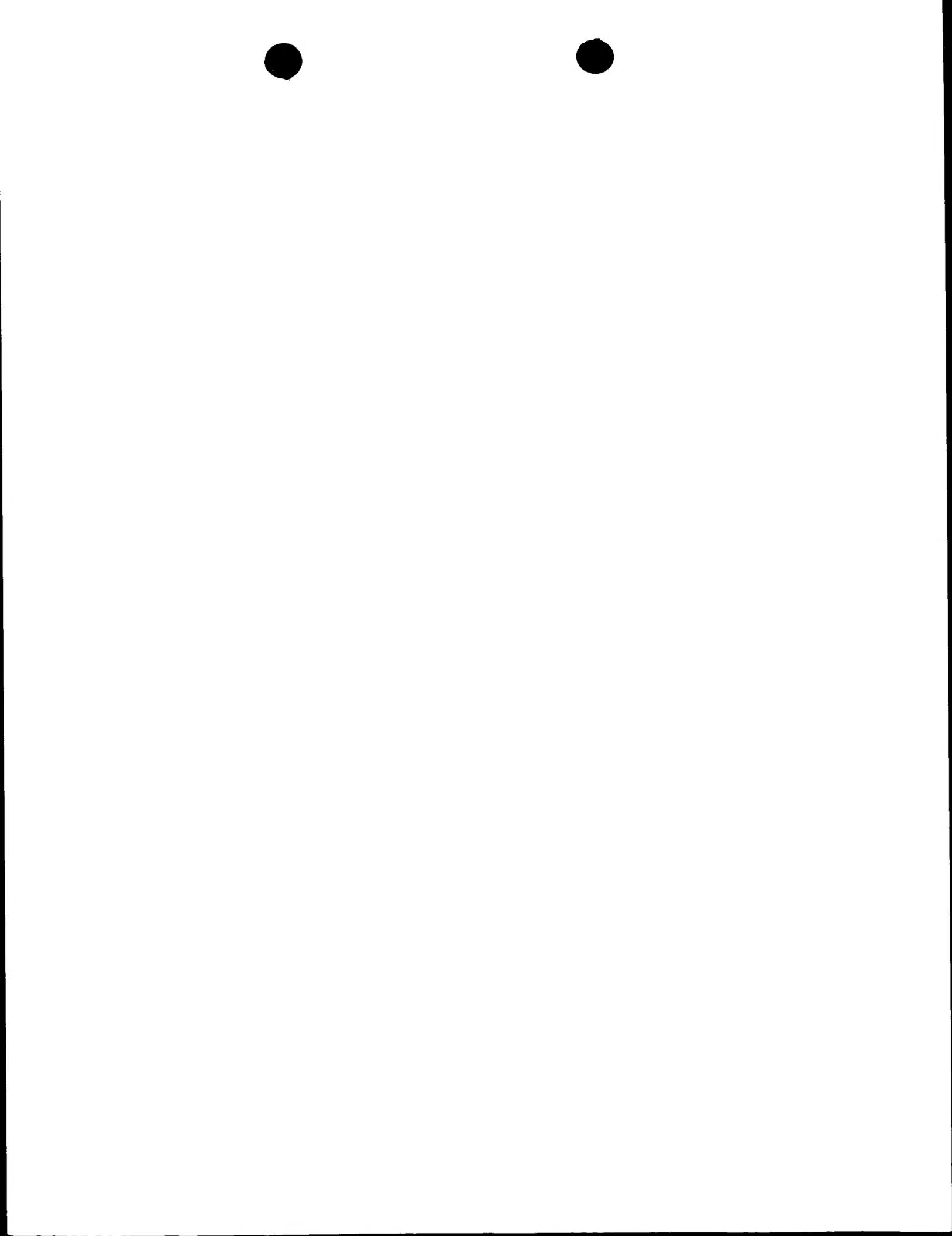
RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT 99/01719

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	<p>WU, D., ET AL.: "THE IMMUTANS VARIEGATION LOCUS OF ARABIDOPSIS DEFINES A MITOCHONDRIAL ALTERNATIVE OXIDASE HOMOLOG THAT FUNCTIONS DURING EARLY CHLOROPLAST BIOGENESIS" THE PLANT CELL, vol. 11, janvier 1999 (1999-01), pages 43-55, XP002131003 Le document en entier</p> <p>-----</p>	1-3,5
T	<p>SMITH, H.: "photosynthetic pigmentation - variegations on a theme" THE PLANT CELL, vol. 11, 1 janvier 1999 (1999-01-01), pages 1-3, XP002131004 Le document en entier</p> <p>-----</p>	1-16



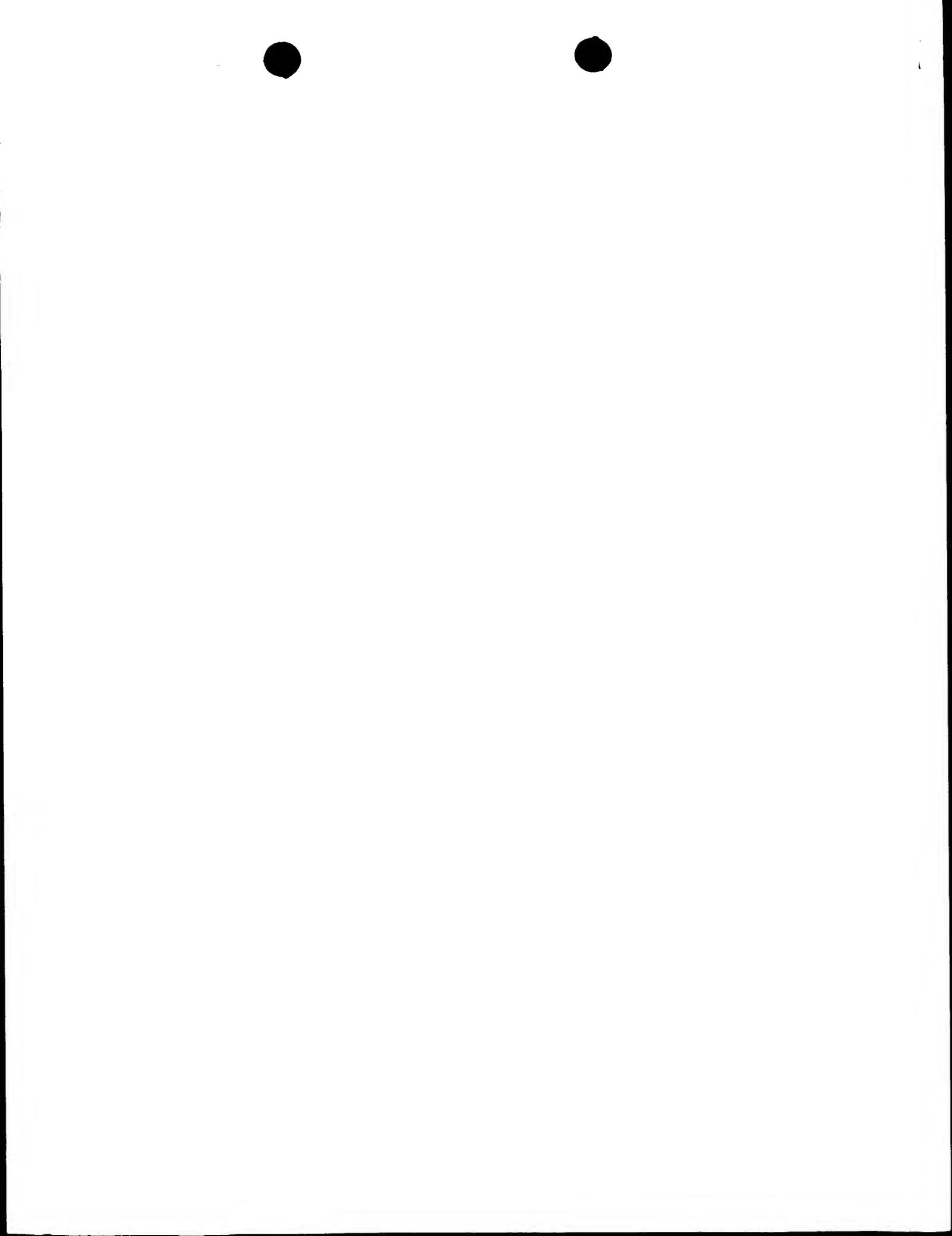
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT 99/01719

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 9534668	A 21-12-1995	US	5922602	A	13-07-1999
		AU	710588	B	23-09-1999
		AU	2653495	A	05-01-1996
		CA	2193094	A	21-12-1995
		EP	0804600	A	05-11-1997
		JP	10501968	T	24-02-1998
		ZA	9504451	A	05-02-1996
WO 9109128	A 27-06-1991	AU	645534	B	20-01-1994
		AU	6893891	A	18-07-1991
		CA	2070831	A	14-06-1991
		EP	0505405	A	30-09-1992
		EP	0699765	A	06-03-1996
		JP	5502160	T	22-04-1993
		US	5750865	A	12-05-1998
		US	5304478	A	19-04-1994





PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 7 : C12N 15/82, 9/02, 5/10, G01N 33/50, A01H 5/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/23605 (43) Date de publication internationale: 27 avril 2000 (27.04.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/IB99/01719			(81) Etats désignés: CA, IL, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Date de dépôt international: 20 octobre 1999 (20.10.99)			
(30) Données relatives à la priorité: 98/13283 20 octobre 1998 (20.10.98)		FR	Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): UNIVERSITE JOSEPH FOURIER [FR/FR]; Boîte postale 53, F-38041 Grenoble Cedex 9 (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): CAROL, Pierre [FR/FR]; Université Joseph Fourier, Génétique Moléculaire des Plantes, Cerimo Boîte Postale 53X, F-38041 Grenoble Cedex (FR). KUNTZ, Marcel [FR/FR]; Université Joseph Fourier, Génétique Moléculaire des Plantes, Cerimo Boîte Postale 53X, F-38041 Grenoble Cedex (FR). MACHE, Régis [FR/FR]; Université Joseph Fourier, Génétique Moléculaire des Plantes, Cerimo Boîte Postale 53X, F-38041 Grenoble Cedex (FR).			
(74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).			

(54) Title: cDNA SEQUENCE TRANSCRIBING A mRNA CODING FOR THE TERMINAL OXYDASE ASSOCIATED WITH CAROTENOID BIOSYNTHESIS AND USES

(54) Titre: SEQUENCE D'ADNc TRANSCRIVANT UN ARNm CODANT POUR L'OXYDASE TERMINALE ASSOCIEE A LA BIOSYNTHESE DES CAROTENOÏDES ET UTILISATIONS

(57) Abstract

The invention concerns a cDNA (complementary deoxyribonucleic acid) sequence represented by SEQ ID NO: 1, transcribing a mRNA (messenger deoxyribonucleic acid), itself coding for the TOCB (terminal oxidase associated with carotenoid biosynthesis) represented by SEQ ID NO: 2, and the complementary sequence of SEQ ID NO:1, vectors transforming cell, plant or fragment of plant, and the method for modifying the production of carotenoids in a plant.

(57) Abrégé

L'invention concerne une séquence d'ADNc (acide désoxyribonucléique complémentaire) représentée par SEQ ID NO:1, transcrivant un ARNm (acide désoxyribonucléique messager), lui-même codant pour l'enzyme OTBC (Oxydase Terminale associée à la Biosynthèse des Caroténoïdes) représentée par SEQ ID NO:2, ainsi que la séquence complémentaire de SEQ ID NO:1, des vecteurs de transformations de cellule, de plante ou fragment de plante, et le procédé pour modifier la production de caroténoïdes dans une plante.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**SEQUENCE D'ADNc TRANSCRIVANT UN ARNm CODANT POUR L'OXYDASE TERMINALE
ASSOCIEE A LA BIOSYNTHESE DES CAROTENOIDES ET UTILISATIONS**

L'invention concerne une séquence d'ADN (acide désoxyribonucléique) décrite par SEQ ID NO:1, transcrivant un 5 ARNm (acide désoxyribonucléique messager), lui-même codant pour l'enzyme OTBC (Oxydase Terminale associée à la Biosynthèse des Caroténoïdes) décrite par SEQ ID NO:2, ainsi que des vecteurs de transformation de cellule, de plante ou fragment de plante, et le procédé pour modifier la production 10 de caroténoïdes dans une plante.

Les caroténoïdes sont des pigments lipophiles synthétisés chez les plantes, les champignons et les bactéries. Dans les tissus photosynthétiques, les caroténoïdes ont une fonction de pigment accessoire d'absorption de la 15 lumière et surtout de photoprotection contre les radicaux libres, tels que l'oxygène singulet.

Chez les plantes et certains micro-organismes, la voie biosynthétique des caroténoïdes produit des carotènes, des xanthophylles et leurs dérivés. Ces composés sont 20 synthétisés à partir du phytoène qui est modifié par des réactions de déshydrogénéation successives pour produire du phytofluène, du zéta-carotène, du neurosporène puis du lycopène. Le lycopène s'accumule dans certain cas, donnant par exemple le pigment rouge de la tomate, ou plus généralement se 25 retrouve sous forme modifiée par cyclisation, pour former de l'alpha- ou du béta-carotène. Ces caroténoïdes cyclisés sont les précurseurs de la vitamine A, et peuvent s'accumuler ou donner, par des réactions d'oxydation, les xanthophylles, qui sont des pigments jaunes, roses, oranges ou rouges.

30 Les étapes de déshydrogénéation successives du phytoène sont catalysées chez la plupart des micro-organismes par une enzyme unique appelée phytoène désaturase CRTI. Chez les plantes et les cyanobactéries, deux enzymes apparentées existent. La première, appelée phytoène désaturase (PDS), catalyse la 35 conversion du phytoène en phytofluène puis en zéta-carotène. La seconde, appelée zéta-carotène désaturase (ZDS), catalyse la

conversion du zéta-carotène en neurosporène puis en lycopène. Chacune de ces réactions de déshydrogénéation nécessite le transfert de deux électrons et deux protons du substrat vers un accepteur. Ces réactions de 5 déshydrogénéation nécessitent donc des enzymes, dites structurales, et des cofacteurs, qui sont des intermédiaires dans les réactions d'oxydoréduction.

Les inventeurs de la présente invention ont découvert un nouveau gène codant pour une enzyme appelée 10 OTBC (Oxydase Terminale associée à la Biosynthèse des Caroténoïdes), impliquée dans la biosynthèse des caroténoïdes. Il semble que cette enzyme soit placée dans les membranes des chloroplastes et soit indispensable au bon fonctionnement de la PDS.

15 Un premier objet selon l'invention concerne donc une séquence d'ADN, comprenant au moins une région codante constituée par :

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO :1, transcrivant un ARNm, cet ARNm codant pour 20 l'enzyme OTBC (Oxydase Terminale associée à la Biosynthèse des Caroténoïdes) décrite par SEQ ID NO:2,

- la séquence nucléotidique modifiée de la séquence SEQ ID NO:1, telle que décrite ci-dessus, particulièrement par mutation et/ou addition et/ou 25 suppression et/ou substitution d'un ou de plusieurs nucléotide(s), cette séquence modifiée transcrivant un ARNm lui-même codant pour l'OTBC décrite par SEQ ID NO:2, ou codant pour une protéine modifiée de ladite OTBC, ladite protéine modifiée ayant une activité enzymatique 30 équivalente à celle de l'OTBC représentée par SEQ ID NO:2.

En particulier, l'invention concerne les séquences codantes de l'OTBC de la tomate, identifiée par SEQ ID NO :3, et du poivron, identifiée par SEQ ID NO :4, respectivement, et toute séquence dérivée obtenue par 35 modification de ces séquences.

Le gène codant pour l'OTBC est une double hélice d'ADN, comprenant des introns et des exons. La séquence SEQ ID NO:1 est le brin complémentaire (sans les introns) ou ADNc, correspondant au brin d'ADN transcrivant l'ARNm codant pour l'OTBC.

Par activité enzymatique équivalente, on entend que l'enzyme, bien que pouvant être modifiée structurellement dans certaines de ses parties, est néanmoins capable de modifier son substrat. Son activité est sensiblement la même que celle de l'enzyme native. On comprendra que cette enzyme ne peut pas être modifiée au niveau de son site actif. De ce fait, toute modification apportée à la séquence native, par addition, suppression ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, s'entend comme engendrant une activité enzymatique équivalente dans la mesure où l'activité de la protéine native n'est pas affectée par ces modifications.

Un second objet selon l'invention concerne une séquence d'ADN comprenant au moins une région codante constituée par:

- la séquence nucléotidique complémentaire représentée par SEQ ID NO:1, cette séquence transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'apparier avec l'ARNm transcrit par la séquence complémentaire de SEQ ID NO: 1,
- la séquence nucléotidique modifiée de la séquence décrite ci-dessus, par mutation et/ou addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotide(s), cette séquence modifiée transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'apparier avec un ARNm mentionné ci-dessus,

- un fragment de l'une des séquences nucléotidiques mentionnées ci-dessus, ledit fragment transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'apparier avec l'ARNm codé par la séquence complémentaire de SEQ ID NO:1.

Par ADN, on peut entendre ADN complémentaire (ou ADNc), c'est à dire la copie de l'ARNm sous sa forme d'ADN

grâce à l'action d'une transcriptase inverse. L'ADNC ne comprend pas les introns des séquences d'ADN.

On entend par « capable de s'apparier » dans la présente invention, le fait que dans des conditions 5 d'hybridations données, les séquences nucléotidiques complémentaires s'apparent. L'homme du métier connaît bien, selon les conditions d'hybridation utilisées, quel est le pourcentage d'identité que les séquences doivent présenter pour qu'un appariement ou une hybridation puisse 10 se réaliser. Les conditions de stringence pour obtenir un appariement de séquences voisines sont par exemple une hybridation dans 50% de formamide à 35°C. Pour ce qui concerne les conditions d'hybridation, on se référera notamment à l'article « Molecular Cloning, a laboratory 15 manual, second edition, Sambrook, Fritch & Maniatis, 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, USA ».

On entend par « séquence nucléotidique modifiée » dans la présente invention, toute séquence nucléotidique 20 présentant avec la séquence de référence un degré d'identité inférieur à 100%.

Dans un mode de réalisation préféré selon l'invention, les séquences nucléotidiques modifiées selon la présente invention comprennent approximativement au 25 moins 70%, et mieux encore au moins 80%, de nucléotides identiques à ceux de la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO:1, ou de sa séquence complémentaire.

On entend par « identité de nucléotide », la comparaison, lorsque les deux brins sont alignés , de la 30 séquence des nucléotides identiques présents sur les deux brins. On obtient de ce fait, en ramenant au nombre de nucléotides totaux, le pourcentage de nucléotides identiques, c'est à dire l'identité de nucléotide.

Un troisième objet selon l'invention concerne un 35 ARNm transcrit à partir de la séquence d'ADN selon la définition du premier objet, et plus particulièrement

transcrit à partir de la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO:1, ledit ARNm codant pour l'enzyme OTBC décrite par SEQ ID NO:2, ou pour un fragment ou une protéine modifiée de l'enzyme, et présentant une activité qui est 5 équivalente à ladite enzyme dans la plante.

Un quatrième objet selon l'invention concerne un ARNm anti-sens transcrit à partir de la séquence d'ADN selon le second objet de l'invention, comprenant des nucléotides qui sont complémentaires de la totalité ou 10 d'une partie des nucléotides constituant l'ARNm natif, et capables de s'apparier avec ledit ARNm.

Par « ARNm anti-sens », on entend une séquence d'ARN qui est complémentaire d'une séquence de bases d'un ARNm correspondant, complémentaire dans le sens où chaque 15 base (ou la majorité des bases) dans la séquence anti-sens (se lisant dans le sens 3' vers 5') est capable de s'apparier avec la base correspondante (G avec C, A avec U) dans la séquence d'ARNm se lisant dans le sens 5' vers 3'.

20 Un cinquième objet selon l'invention concerne une protéine ayant l'activité de l'enzyme OTBC décrite par SEQ ID NO:2, ou toute protéine modifiée de ladite enzyme OTBC, particulièrement par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ou 25 tout fragment provenant de l'enzyme OTBC ou d'une séquence modifiée de l'enzyme, ledit fragment ou séquence modifiée présentant une activité enzymatique équivalente à celle de l'enzyme OTBC.

30 Un sixième objet selon l'invention concerne un complexe formé entre un ARNm anti-sens défini dans le quatrième objet selon l'invention, et un ARNm codant pour une enzyme OTBC dans la plante.

35 Un septième objet selon l'invention est un ADN recombiné comprenant une séquence d'ADN définie dans le premier objet selon l'invention, ladite séquence étant insérée dans une séquence hétérologue, lesdites séquences

transcrivant tout ou partie d'une séquence ARNm codant pour tout ou partie de l'enzyme OTBC, cette dernière ayant une activité enzymatique équivalente à l'enzyme OTBC de la plante.

5 Par « séquence hétérologue » on entend, selon la présente invention, toute séquence pouvant être coupée par des enzymes, et servant de ce fait à insérer d'autres séquences présentant des activités diverses.

Un huitième objet selon l'invention est un ADN
10 recombiné comprenant une séquence d'ADN définie dans le second objet selon l'invention, ladite séquence étant insérée dans une séquence hétérologue, lesdites séquences transcrivant tout ou partie d'une séquence ARNm anti-sens capable de s'apparier avec un ARNm codant pour une enzyme
15 OTBC dans la plante.

Un neuvième objet selon l'invention est un ADN recombiné défini dans le septième ou huitième objet selon l'invention, comprenant les éléments nécessaires pour contrôler l'expression de la séquence insérée,
20 particulièrement une séquence promotrice et une séquence de terminaison de transcription desdites séquences.

Un dixième objet selon l'invention concerne un vecteur de transformation de plantes, adapté pour augmenter la biosynthèse des caroténoïdes, comprenant tout
25 ou partie de la séquence nucléotidique de SEQ ID NO:1 comme définie dans le premier objet selon l'invention, codant pour tout ou partie d'une enzyme impliquée dans la synthèse des caroténoïdes, représentée par SEQ ID NO:2, précédé par une origine de réPLICATION de la transcription
30 des plantes, de manière à ce que le vecteur puisse générer de l'ARNm dans les cellules des plantes.

Un onzième objet selon l'invention concerne un vecteur de transformation de plantes, adapté pour diminuer ou arrêter la biosynthèse des caroténoïdes, comprenant tout ou partie du brin de la séquence nucléotidique complémentaire de SEQ ID NO:1 comme définie dans le second

objet selon l'invention, précédé par une origine de réPLICATION de la transcription des plantes, de manière à ce que le brin complémentaire transcrit puisse s'apparier à l'ARNm codant pour l'enzyme OTBC de la plante impliquée 5 dans la synthèse des caroténoïdes.

L'invention peut donc être utilisée pour modifier la synthèse des caroténoïdes, par exemple augmenter ou diminuer, voire arrêter, la production des couleurs associées à la déshydrogénération du phytoène. Par exemple, 10 l'inhibition de la couleur rouge dans les fruits tels que les tomates, par transformation avec un vecteur comprenant une séquence anti-sens, donne un fruit d'une couleur attrayante se rapprochant du jaune, comme celle de certains poivrons. Il existe déjà des tomates jaunes de 15 cette sorte, mais la présente invention fournit un moyen de transférer la caractéristique couleur dans des lignées, sans qu'un programme de reproduction prolongé ne soit nécessaire et puisse de ce fait engendrer l'altération d'autres caractéristiques de la plante.

20 L'augmentation de la synthèse des caroténoïdes, par transformation avec un vecteur comprenant une séquence sens, peut permettre de produire des tomates de couleur plus rouge, ce qui peut apparaître plus appétissant au consommateur. L'invention peut également servir à 25 introduire une couleur rouge à l'intérieur d'une plante, ailleurs que dans le fruit. L'augmentation de la synthèse des caroténoïdes dans une plante peut être effectuée en insérant une ou plusieurs copies fonctionnelles du gène d'ADN complémentaire, ou le gène complet, sous contrôle 30 d'un promoteur fonctionnel dans les cellules de plantes.

Les vecteurs de transformation des plantes pour diminuer ou arrêter la synthèse des caroténoïdes, c'est à dire les vecteurs anti-sens, peuvent être très courts. Dans un mode de réalisation préférentiel, on choisira des 35 séquences de bases homologues ayant une longueur d'au moins 10 bases. Il n'existe pas de limite supérieure

théorique à la séquence de bases, elle peut être aussi longue que l'ARNm produit par la plante. Dans un mode de réalisation très préférentiel, on utilisera cependant des séquences de longueur comprise entre 100 et 1000 bases.

5 On sait que les plantes mutantes chez qui le gène OTBC est inactif présentent un aspect panaché, les plantes sont vertes et blanches. On propose une application de la stratégie anti-sens, qui vise à éliminer la production d'ARNm et donc de la protéine OTBC, qui viserait à 10 produire des plantes au feuillage panaché comme par exemple des plantes ornementales, de type Nicotiana ou Pétunia ou toute autre plante ornementale, qui se prête à la transformation génétique et qui pourrait recevoir une construction anti-sens dans le but d'empêcher la 15 production de la protéine OTBC.

Les produits de recombinaison d'ADN peuvent être fabriqués en utilisant des techniques standards. Par exemple, la séquence d'ADN à transcrire peut être obtenue en traitant un vecteur contenant ladite séquence avec des 20 enzymes de restriction pour couper le segment approprié. La séquence d'ADN de transcription peut également être engendrée en cyclisant et liant des oligonucléotides synthétiques ou en utilisant des oligonucléotides synthétiques dans une PCR (« Polymerase Chain Reaction ») 25 pour engendrer des sites de restriction à chaque extrémité. La séquence d'ADN est alors clonée à l'intérieur d'un vecteur contenant une séquence promotrice d'initiation et une séquence de terminaison. Si l'on désire obtenir une séquence d'ADN anti-sens, le clonage 30 sera effectué de manière à ce que la séquence d'ADN coupée soit inversée par rapport à son orientation dans le brin duquel elle a été coupée.

Dans un produit de recombinaison exprimant un ARN anti-sens, le brin qui était initialement le brin matrice 35 devient le brin codant, et vice versa. Le produit de recombinaison transcrira de ce fait un ARNm dont la

séquence de base est complémentaire de tout ou partie de la séquence de l'ARNm de l'enzyme. De ce fait, les deux brins d'ARN sont complémentaires non seulement dans leurs séquences de bases mais également dans leur orientation 5 (5' vers 3').

Dans un produit de recombinaison exprimant un ARN sens, la matrice et les brins transcrits gardent l'orientation du gène initial de la plante. Les produits de recombinaison exprimant de l'ARN sens transcrivent un 10 ARNm ayant une séquence de bases qui est homologue en tout ou partie avec la séquence de l'ARNm. Dans les produits de recombinaison exprimant l'enzyme fonctionnelle, la région codante complète du gène est reliée à des séquences de contrôle de la transcription capables de s'exprimer dans 15 la plante.

Par exemple, les produits de recombinaison selon la présente invention peuvent être fabriqués comme décrit ci-après. Un vecteur adapté contenant la séquence de base souhaitée pour la transcription, tel que notamment un 20 clone d'ADN complémentaire d'OTBC, est traité avec des enzymes de restriction pour couper la séquence. On clone alors l'ADN ainsi obtenu, dans une orientation inversée si on le souhaite, dans un second vecteur contenant la séquence promotrice souhaitée et la séquence de 25 terminaison souhaitée. Parmi les promoteurs adaptés, on peut citer le promoteur nommé 35S du virus du CaMV, à titre d'exemple de promoteur considéré comme étant constitutif ; le promoteur du gène de la polygalacturonase de tomate (voir Bird et al., 1998, Plant Molecular 30 Biology, 11:651-662) comme exemple de promoteur impliqué dans la régulation des fruits ; ou encore le promoteur du gène de la petite sous-unité de la ribulose bis-phosphate carboxylase, comme exemple de promoteur exprimé dans les tissus verts. Les séquences de terminaison comprennent le 35 terminateur NOS du gène nopaline synthase.

Il peut être intéressant de modifier l'activité enzymatique de la plante durant seulement le développement et/ou le mûrissement des fruits. L'utilisation d'un promoteur constitutif tendra à modifier le taux et 5 l'activité des enzymes dans toutes les parties de la plante transformée, alors que l'utilisation d'un promoteur spécifique à un tissu contrôlera de manière plus sélective l'expression du gène et modifiera l'activité, par exemple la coloration des fruits. De ce fait, en mettant en oeuvre 10 l'invention, par exemple dans des poivrons, il sera adapté d'utiliser un promoteur qui permettra l'expression spécifique au cours du développement et/ou le mûrissement des fruits. Enfin, l'ARN sens ou anti-sens sera alors produit seulement dans les organes de la plante où l'on 15 souhaite qu'il y ait une action. Parmi les promoteurs spécifiques de développement et ou de mûrissement des fruits qui peuvent être utilisés, on peut citer le promoteur de stimulation de la polygalacturonase (Demande de brevet internationale publiée sous le numéro 20 WO-A-92/08798), le promoteur E8 (Dieckman & Fischer, 1998, EMBO, 7:3315-3320) et le promoteur spécifique des fruits 2A11 (Pear et al., 1989, Plant Molecular biology, 13: 639- 651).

Un douzième objet selon l'invention concerne une 25 cellule de plante transformée par un vecteur défini dans le dixième ou le onzième objet selon l'invention.

L'homme de l'art dans la technique du génie génétique végétal connaît bien aujourd'hui les différentes techniques d'obtention de plantes génétiquement modifiées. 30 On sait que la paroi végétale constitue une barrière mécanique naturelle particulièrement efficace à la pénétration de tout matériel étranger dans la cellule et, en particulier, à celle d'ADN. Les différents techniques spécifiques d'introduction de l'ADN dans la cellule 35 végétale sont par exemple l'utilisation de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, l'électroporation de

protoplastes, la micro-injection d'ADN nu, l'utilisation de canon à particules ou biolistique, ou la transformation de protoplastes.

Afin de pouvoir sélectionner les cellules effectivement transformées, on introduit, en plus du gène codant pour le caractère que l'on recherche, un gène marqueur. On choisira préférentiellement un gène conférant une résistance à un antibiotique. Les cellules sont alors sélectionnées par culture sur un milieu contenant cet antibiotique. Seules les cellules possédant le gène de résistance pourront se multiplier. La présence du gène d'intérêt peut également être vérifiée par hybridation avec de l'ADN complémentaire de l'ADN introduit.

Le produit de recombinaison selon l'invention est transféré à l'intérieur d'une cellule de plante cible. La cellule de plante cible peut être une partie d'une plante complète ou peut être une cellule isolée ou partie d'un tissu qui peut être régénéré à l'intérieur d'une plante complète. La cellule de plante cible peut être choisie parmi toute espèce de plante monocotylédone ou dicotylédone. Les plantes adaptées comprennent toute plante portant des fruits, telles que notamment les tomates, les mangues, les pêches, les pommes, les poires, les fraises, les bananes, les melons, les poivrons, les piments, le paprika, les plantes ayant des feuilles, des fleurs ou tout autre organe dans lesquels on souhaite modifier le contenu en caroténoïdes.

Les produits de recombinaison selon l'invention peuvent être utilisés pour transformer toute plante, en utilisant toute technique adaptée pour transformer des plantes selon l'invention. Les cellules des plantes monocotylédones et dicotylédones peuvent être transformées de différentes manières connues par l'homme de l'art. Dans la plupart des cas, les cellules de ces plantes, particulièrement lorsque ce sont des cellules de plantes dicotylédones, peuvent être mise en culture pour générer

une plante entière qui se reproduit par la suite en engendrant des générations successives de plantes modifiées génétiquement. Tout procédé adapté pour la transformation des plantes peut être utilisé. Par exemple, 5 les plantes dicotylédones, telles que la tomate et le melon, peuvent être transformées en utilisant le plasmide Ti Agrobacterium. De telles plantes transformées peuvent se reproduire par croisement, ou par culture de cellule ou de tissu.

10 Un treizième objet selon l'invention concerne une plante, ou fragment de plante, particulièrement fruit, graine, pétale, feuille, comprenant des cellules définies selon le douzième objet de l'invention.

Les plantes ou fragments de plantes, génétiquement 15 modifiées selon l'invention avec un vecteur comprenant une séquence sens, notamment pour augmenter la production de caroténoïdes, comprennent un taux élevé en précurseur de la vitamine A par rapport au taux normal produit par la plante.

20 Les caroténoïdes, outre leur rôle dans la couleur de la plante, ont également un rôle de protection des plantes contre les dommages que peut produire une haute intensité lumineuse. De ce fait, les plantes, contenant par modification génétique un taux plus élevé de ces 25 caroténoïdes, peuvent présenter un grand intérêt pour les régions où la culture s'effectue avec des changements de température importants.

Les plantes modifiées génétiquement peuvent présenter des couleurs différentes, selon que l'on ait 30 augmenté ou diminué la synthèse des caroténoïdes. Plus particulièrement, les produits de recombinaison de l'OTBC peuvent être utilisés pour stimuler ou inhiber la production des couleurs associées aux caroténoïdes produits lors des réactions de désaturation, par exemple 35 le lycopène rouge, ou dérivés de produits comme la couleur jaune/orange associée au bêta-carotène. La stimulation de

la production des bêta-carotènes, avec un produit de recombinaison sens de sur-expression, peut permettre de produire des poivrons de couleur jaune/orange, ou bien une couleur déterminée par un dérivé des bêta-carotènes telle qu'un rouge plus intense, du fait de la biosynthèse de capsorubine ou de capsanthine. Les poivrons obtenus s'avéreront plus appétissants par le consommateur.

Comme exemple de plantes génétiquement modifiées selon la présente invention, on citera plus particulièrement les plantes portant des fruits. Les fruits de ces plantes peuvent donc être rendus plus attrayants pour le consommateur, en stimulant ou intensifiant à l'intérieur une couleur spécifique. Comme autres plantes qui peuvent être modifiées génétiquement, on peut citer les tubercules tels que les radis, les navets et les pommes de terre, de même que les céréales tels que le maïs, le blé, l'orge et le riz.

Les plantes modifiées génétiquement selon l'invention, peuvent également contenir d'autres produits de recombinaison, par exemple des produits de recombinaison ayant d'autres effets, notamment sur le mûrissement des fruits. Par exemple, des fruits ayant une couleur plus intense, modifiés selon la présente invention, peuvent également contenir des produits de recombinaison, soit qui inhibent la production de certaines enzymes telles que la polygalacturonase et la pectinestérase, soit qui interfèrent avec la production d'éthylène. Les fruits qui contiennent ces deux types de produits de recombinaison peuvent être engendrés, soit par des transformations successives, soit en croisant deux variétés qui contiennent chacune un des produits de recombinaison, puis en sélectionnant parmi la descendance ceux qui contiennent les deux produits de recombinaison.

Un quatorzième objet selon l'invention concerne un procédé pour modifier la production de caroténoïdes dans une plante, soit en augmentant la production de

caroténoïdes, soit en abaissant ou inhibant la production de caroténoïdes par la plante, relativement au contenu normal de caroténoïdes produits par la plante, ledit procédé comprenant la transformation de cellules desdites 5 plantes à transformer avec un vecteur défini dans le dixième et le onzième objet selon l'invention.

Un quinzième objet selon l'invention concerne un procédé pour produire des caroténoïdes dans une cellule de plante, ou eucaryote ou procaryote, ledit procédé 10 comprenant la transformation de cellules desdites plantes, des cellules eucaryotes ou procaryotes à transformer avec un vecteur défini dans le dixième objet selon l'invention.

Les bêta-carotènes, produits par un organisme eucaryote ou procaryote exprimant un produit de 15 recombinaison codant pour l'enzyme OTBC, peuvent être extraits pour être utilisés en tant que colorant, anti-oxydant ou précurseur de la vitamine A.

Enfin, l'invention concerne aussi un procédé pour la sélection de composé présentant un caractère herbicide, 20 selon lequel on met en contact ledit agent avec des cellules ou des membranes de cellules, notamment des cellules de l'invention, et on observe une diminution de la consommation d'oxygène par les membranes desdites cellules, liée à l'inhibition de l'oxydase terminale 25 associée à la biosynthèse des caroténoïdes. Des techniques appropriées pour effectuer cette observation sont notamment illustrée dans l'exemple 6.

La figure 1 présente la séquence d'ADNc et la 30 séquence d'acides aminés correspondante de l'OTBC. Le peptide N-terminal de transit potentiel du chloroplaste est souligné. Le point probable de clivage est indiqué par une étoile (*). Les triangles ouverts indiquent la position des introns.

35 La figure 2 montre la comparaison entre la protéine OTBC et la protéine AOX de la graine de soja. (+)

indique les acides aminés similaires. Les acides aminés présentés dans une boîte font partie des domaines en hélice trans-membranaire prédicts. Les motifs de liaison du fer sont soulignés.

5 La figure 3 présente l'alignement des séquences en acides aminés pour la tomate (T), le poivron (P) et *Arabidopsis* (A) et la séquence consensus. Dans cette séquence consensus, les acides aminés conservés sont indiqués en lettre majuscule et les acides aminés relativement conservés sont indiqués en lettre minuscule.
10

La figure 4 représente la consommation d'oxygène dans des membranes cellulaires de *E.coli* isolées pour des cellules témoins transformées par un vecteur de clonage de l'invention et pour des cellules exprimant le produit du 15 gène « IMMUTANS » (plastid terminal oxidase).

Exemple 1 : Détail du clonage du locus codant pour la protéine OTBC

20 1- Isolement du mutant.

On a provoqué la mutation par l'utilisation d'un transposon introduit dans le génome de la plante *Arabidopsis thaliana* cultivar *landsberg-erecta*.

Cette technique est largement décrite dans un 25 article (Long, D., Martin, M., Sundberg, E., Swinburne, J., Puangsomlee P., and Coupland, G. (1993) The maize transposable element system Ac/ Ds as a mutagen in *Arabidopsis* : Identification of an albino mutation induced by Ds insertion. Pro. Natl. Science USA, 10, 10370-10374) et a été mise en œuvre par d'autres au laboratoire de George Coupland au John Innes Centre for Plant Science, 30 Colney, Norwich, NR4 7UH, Nordwich, Grande-Bretagne.

La transposition de l'élément transposable Dissociator (Ds) utilisé ici a été déclenchée par la 35 production de la protéine transposase (ou Transposase de l'élément Activator, Ac).

Parmi la descendance d'une plante ayant subi la transposition de l'élément Ds, on a identifié plusieurs plantes à l'aspect mutant albinos, différent du sauvage par l'absence de pigmentation verte (chlorophylle). On a 5 également identifié des plantes d'aspect sauvage mais qui transmettent la mutation à leur descendance. Ces plantes sont identifiées comme hétérozygotes, portant la mutation sur un seul chromosome. Les plantes homozygotes ont un phénomène mutant et portent la mutation sur les deux 10 chromosomes homologues.

2- Test de liaison de la mutation à l'élément transposable Ds.

Cette expérience a été faite dans le but de 15 prouver que la mutation observée est causée par l'insertion de l'élément Ds dans un gène nécessaire au bon fonctionnement de la plante et à son aspect sauvage.

L'élément transposable, ou transposon, Ds, est construit de façon à porter un gène de résistance à 20 l'antibiotique hygromycine (décrit dans les références précédentes). On a fait pousser la descendance de 35 plantes hétérozygotes qui portent la mutation albinos sur un milieu gélosé contenant une dose létale d'hygromycine, toutes les plantes qui portent la mutation sont aussi 25 résistantes à l'hygromycine. On en tire la conclusion que la mutation est liée au gène de résistance porté par le transposon.

On a isolé une portion d'ADN de plante résistante à l'antibiotique hygromycine, jouxtant le transposon. Ceci 30 a été fait selon la méthode IPCR ou PCR-inverse décrite dans les références précédentes.

Par expérience dite de « Southern blot », on a remarqué que les lignées qui portent la mutation ont une altération de l'ADN génomique. Cette altération est 35 révélée lorsque l'on utilise comme « sonde » la portion d'ADN isolée jouxtant le transposon.

3- Isolement du gène

On a, en utilisant une méthode de criblage de banque d'ADN génomique, isolé un clone contenant un fragment d'ADN génomique pouvant contenir la version sauvage inaltérée du gène interrompu chez le mutant.

La banque d'ADN criblée a été construite. Elle est décrite dans la publication de Whitelam, G.C., Johnson, E., Peng, J., Carol P., Anderson, M.L., Cowl, J.S. & Harberd, N.P. (1993) Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *The Plant Cell* 5, 757-768.

On a déterminé la séquence totale d'un fragment de restriction obtenu par digestion enzymatique du clone d'ADN génomique par l'enzyme EcoR I. La séquence obtenue couvre 3000 paires de bases. Parmi ces 3000 paires de bases, on trouve une partie identique à la séquence du fragment bordure préalablement isolé, confirmant l'identité entre l'ADN isolé et le gène interrompu par le transposon.

4- Isolement et caractérisation de la séquence codante.

On a utilisé une banque d'ADNc, qui est une banque commerciale vendue par CLONTECH Laboratories, Inc.. Il s'agit d'une banque d'ADNc faite à partir d'ARNm extraits d'*Arabidopsis thaliana*, transformés en ADNc, puis clonés dans le vecteur plasmidique pGAD10.

A partir de cette banque de données d'ADNc, et selon les techniques habituelles, utilisant le gène identifié précédemment comme sonde, on a isolé plusieurs clones contenant un ADNc d'une taille d'environ 1400 paires de bases.

On a déterminé la séquence totale de l'ADNc et montré que celui-ci est entièrement compris dans le fragment d'ADN génomique préalablement identifié. On a

placé la partie codante (ou exons) et la partie non codante (introns) du gène sur la séquence du gène. Le gène porte 9 exons et 8 introns. L'insertion du transposon Ds est identifiée au début du deuxième exon et vient donc 5 interrompre la partie codante du gène.

La séquence de l'ADNc présente un codon de départ potentiel suivi par un cadre de lecture ouvert de 350 acides aminés, codant pour une protéine potentielle de 39 kDa dénommée OTBC. Une recherche d'homologie en utilisant 10 le programme blastp [(Altshul et al. (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402] a révélé une homologie faible mais significative avec des polypeptides appartenant à la famille des protéines 15 oxydase alternative ou terminale oxydase de mitochondries (AOX). Aucune autre homologie significative n'a été trouvée. L'homologie commence à l'acide aminé 111 et présente 29% d'identité (45% de similarité) avec l'oxydase de soja. Malgré la faible identité avec la protéine AOX, 20 une recherche par ordinateur de structures secondaires et des domaines potentiels de la signification biologique ont révélé une similarité structurale entre la protéine OTBC et AOX. Des domaines en hélice trans-membranaire trouvés dans AOX sont situés à des positions similaires sur la 25 séquence peptidique de l'OTBC, suggérant une localisation membranaire de l'OTBC et également une configuration similaire à celle de l'AOX dans la membrane. De plus, un motif de liaison du fer se trouve conservé entre OTBC et AOX. L'alignement des séquences entre les protéines OTBC 30 et AOX montre une insertion de 19 acides aminés dans la protéine OTBC qui correspond à une partie des exons 7 et 8.

La séquence N-terminale de la protéine OTBC présente les caractéristiques d'un peptide de transit du 35 chloroplaste, qui est riche en leucine, arginine et sérine / thréonine. Une analyse par ordinateur du

potentiel peptide de transit (psort software, Nakai and Kanehisa, 1992) a suggéré une cible possible de OTBC au niveau des compartiments des thylakoides du chloroplaste.

5 5- Identification de la mutation.

L'aspect du mutant est proche de celui d'un mutant déjà décrit dans la littérature : le mutant "immutans", Wetzel C.M., Jiang C-Z., Meehan L.J., Voytas D.L., Rodermel S.R. (1994) Nuclear-organelle interactions: the 10 immutans variegation mutant of *Arabidopsis* is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis, Plant Journal 6, 161-175.

On a croisé le mutant « immutans » (allèle spotty, cf. référence précédente) avec celui qui a été isolé selon 15 l'invention. La descendance du croisement est d'aspect mutant, ce qui est un résultat attendu si les deux mutations affectent le même gène. On peut donc affirmer que le gène identifié correspond à la version sauvage du locus IMMUTANS et que le mutant obtenu porte une version 20 interrompue du gène dont le produit est alors inactif.

Le premier objet de la présente invention se distingue donc du mutant ci-dessus, en ce qu'il code pour une protéine présentant une activité enzymatique identique ou équivalente à celle de l'OTBC, alors que le produit 25 codé par « immutans » n'a pas d'activité.

Exemple 2 : Construction d'un vecteur de l'invention par introduction d'ADNc codant pour l'OTBC de poivron dans un vecteur d'expression de plantes

30

Le vecteur pBI121 (commercialisé par Clontech laboratories, Inc) est un vecteur adapté à cette construction.

Il comporte une région T-DNA que la bactérie 35 *Agrobacterium tumefaciens* peut transférer dans le génome des plantes.

Cette région T-DNA comporte, entre autres, un promoteur constitutif (le promoteur nommé 35S du virus CaMV), le gène GUS suivi du terminateur NOS (du gène nopaline synthase). Le gène GUS ne présentant aucun 5 intérêt pour l'invention, est remplacé par un ADNC codant pour l'OTBC. Cet ADNC sera donc placé sous le contrôle du promoteur 35S et du terminateur NOS.

Tout autre promoteur constitutif ou non (dans ce dernier cas, il devra être spécifique de l'organe dont on 10 souhaite modifier les propriétés) et tout autre terminateur sont également utilisables.

Un ADNC codant pour l'OTBC a été sous-cloné originellement dans le site de restriction NotI du plasmide bactérien pBluescriptKS : il a ainsi été flanqué 15 de sites de coupures BamH1 en 5' et SacI en 3'.

Cet ADNC est excisé du plasmide pBluescriptKS par les enzymes de restriction BamH1 et SacI. Ce fragment BamHI-Sacl est inséré dans le vecteur pBI121 lui-même coupé par ces enzymes : le site BamH1 se trouve en 3' du 20 promoteur 35S et en 5' du gène GUS, le site SacI se trouve en 3' du gène GUS et en 5' du terminateur NOS.

Après ligation, sont sélectionnés les dérivés du vecteur pBI121 dans lequel l'ADNC codant pour l'OTBC (c'est-à-dire sans intron) a remplacé le gène GUS.

25

Exemple 3 : Transformation d'une cellule de plante pour obtenir une cellule transformée de l'invention.

Le vecteur de transformation de plante dérivé de 30 pBI121 obtenu à l'exemple 2 est introduit dans la souche d'*Agrobacterium* LBA4404 par électroporation. La souche recombinante est sélectionnée en présence de 50 µg/ml de kanamycine.

Cette souche transformée d'*Agrobacterium* est 35 utilisée pour la transformation de cellules de plantes, par exemple de tabac.

La technique utilisée à cet effet et qui peut être remplacée par toute autre technique de transformation, est celle de l'infection de disques foliaires de plantules de tabac cultivées *in vitro*. Les cellules transformées de 5 plantes sont sélectionnées en présence de kanamycine. *Agrobacterium* est éliminé par l'antibiotique céfotaxime. Les disques foliaires sont cultivés sur milieu de culture végétale en présence d'hormones végétales (auxine et cytokinines) favorisant la croissance de cals. Les cals 10 issus de la croissance des cellules transformées sont utilisés pour la régénération de plantes entières par les techniques classiques. Par exemple, les cals sont transférés sur milieu de culture végétale en présence de cytokinine pour induire la formation de pousses. Celles-ci 15 sont ensuite coupées et transférées sur milieu de culture végétale sans hormone afin de régénérer des racines. Les antibiotiques kanamycine (afin de sélectionner la croissance de tissus transformés) et céfotaxime (afin d'éliminer complètement *Agrobacterium*) sont maintenus 20 pendant toutes ces phases de culture.

Les plantes transformées sont mises en culture stérilement en présence de kanamycine et céfotaxime puis sont transférées en terre et cultivées en serre jusqu'à la récolte des graines. La présence du transgène a été 25 confirmée par hybridation de l'ADN génomique de ces plantes avec une sonde spécifique issue du vecteur de transformation utilisé.

Exemple 4 : Clonage et caractérisation d'ADNc de 30 fruits de poivron et de tomate correspondant à l'enzyme oxydase terminale associée à la biosynthèse des caroténoïdes (OTBC)

On a utilisé la partie d'ADNc de « immutans » 35 d'*Arabidopsis* codant pour le peptide OTBC mature comme sonde pour rechercher une banque d'ADNc de poivron vert ou

rouge dans des conditions non stringentes. Tous les clones positifs qui ont été analysés, ont semblé dériver du même gène, comme le suggèrent les séquences identiques observées dans la région non traduite en 3'. La séquence 5 d'ADN du clone complet est présentée dans la liste de séquence sous l'identificateur SEQ ID NO :3. La séquence déduite en acides aminés est présentée dans la liste de séquences sous l'identificateur SEQ ID NO :4. L'ADNc de poivron a ensuite été utilisé pour isoler l'ADNc 10 correspondant à partir d'une banque d'ADNc de tomate rouge (SEQ ID NO :5).

La figure 3 présente la comparaison entre la séquence déduite en acides aminés précitée et les séquences de l'OTBC de poivron et d'Arabidopsis.

15 Les peptides de transit utilisés pour le ciblage dans les plastides ont révélés une similarité de séquence, à l'exception de la région N-terminale et de la région près du site de clivage supposé (ATR/Q-AT). Les polypeptides d'OTBC mature partagent pourtant une forte 20 similarité de séquence, ce qui signifie qu'ils présentent les mêmes propriétés.

Un alignement des séquences de l'OTBC a en outre révélé la présence de deux domaines trans-membranaires potentiels conservés, séparés par un segment hydrophile 25 fortement conservé. Le domaine N-terminal est essentiellement hydrophile et contient un long segment d'acides aminés faiblement conservés. Le domaine C-terminal est aussi principalement hydrophile et contient un motif (EAEH) conservé qui concorde avec un site putatif 30 de fixation du fer (ExxH). En outre, la région contient 6 résidus cystéine conservés dans l'OTBC, alors que le reste du polypeptide est dépourvu de résidus cystéine.

Certains de ces résidus cystéine peuvent être impliqués dans la dimérisation covalente de la protéine.

Exemple 5 : Expression des gènes de l'OTBC au cours du mûrissement du fruit chez le poivron et la tomate

Afin de définir le mécanisme d'expression des 5 gènes de l'OTBC, on a extrait l'ARN total du fruit à différents stades du mûrissement. Le mécanisme d'expression a été déterminé par transcription inverse de l'ARN total, suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR).

Le gène de l'OTBC est exprimé au cours du développement et du mûrissement du fruit pour le poivron. En outre, il a un mécanisme d'expression similaire à celui des gènes codant pour les caroténoïde-désaturases, c'est-à-dire la phytoène-désaturase et la zéta-carotène-désaturase. On observe une augmentation du taux de transcription entre le stade vert non mûr et le stade vert mûr (fruit d'une taille adulte), suivie d'une autre augmentation entre le stade vert mûr et le stade de dégradation (signes visibles précoce de changement de couleur). Le taux de transcription reste ensuite assez constant (avec une légère diminution au cours de l'étape de rougissement).

Le gène de l'OTBC est également exprimé durant le développement et le mûrissement du fruit chez la tomate. Chez la tomate, il présente aussi un mécanisme d'expression similaire à celui des gènes codant pour les caroténoïde-désaturases (phytoène-désaturase et zéta-carotène-désaturase). On observe une augmentation du taux de transcription entre le stade vert non mûr et le stade vert mûr (fruit d'une taille adulte), suivie d'une autre augmentation plus forte entre le stade vert mûr et le stade de dégradation.

Lorsque l'empreinte de la protéine des fruits du poivron et de la tomate a été recherchée, en utilisant des anticorps dirigés contre l'OTBC, ce polypeptide a été retrouvé à différents stades de développement du fruit.

Ces essais ont mis en évidence une augmentation du taux de la protéine OTBC, depuis le stade vert mûr vers le stade de dégradation. Ce taux de protéine est resté élevé au cours du mûrissement du fruit.

5 Ces résultats démontrent que les gènes de l'OTBC sont exprimés et que la protéine OTBC est présente dans le fruit. De manière analogue aux enzymes structurales intervenant dans la désaturation des caroténoïdes, le gène de l'OTBC est induit et les protéines sont accumulées au 10 cours du mûrissement quand la biosynthèse des caroténoïdes est accrue.

Les résultats exposés dans la description mettent en évidence que l'OTBC est un élément du système de la biosynthèse des caroténoïdes.

15 On peut envisager d'utiliser la protéine OTBC pour modifier la biosynthèse des caroténoïdes, notamment dans les tissus ou les cellules végétales ou dans les bactéries présentant un système de biosynthèse des caroténoïdes peu efficace ou inefficace. L'OTBC pourrait être produite en 20 même temps que les enzymes structurales de la biosynthèse des caroténoïdes pour accroître l'efficacité de la production des caroténoïdes.

Exemple 6 : Propriétés catalytiques de l'OTBC
25 analysées après son expression chez *E. coli*

Un produit de synthèse consistant en la région codant pour le polypeptide mature OTBC de *Arabidopsis* a été inséré dans un vecteur d'expression procaryote (tel 30 que pQE31, commercialisé par QIAGEN, étant entendu que tout autre vecteur conduirait à des résultats identiques).

La région codante destinée à être insérée dans le vecteur d'expression peut être obtenue par clivage à l'aide d'enzymes de restriction intervenant près des 35 codons correspondant au site de clivage du peptide de transit.

Alternativement, une amplification par PCR de la région codante peut être effectuée. Les oligonucléotides suivants seront avantageusement utilisés pour l'amplification de la séquence de l'OTBC d'Arabidopsis :

5 5'-GCAACGATTGGCAAGACG-3' et

5'-TTAACTTGTAAATGGATTCTTGAG-3'

D'autres produits d'assemblage comportant la région codante pour l'OTBC chez d'autres espèces (comme le poivron ou la tomate) peuvent aussi être employés.

10 Ces plasmides peuvent être introduits dans des cellules de *E.coli* selon des techniques classiques. Afin d'obtenir la protéine recombinante chez *E.coli*, les cellules sont cultivées dans les conditions suivantes : 10 ml d'une pré-culture d'une nuit complète dans un milieu riche sont déposées dans 300 ml de milieu M9 (Na_2HPO_4 34mM, 15 KH_2PO_4 22mM, NH_4Cl 18 mM, NaCl 8,5 mM, MgSO_4 1 mM, CaCl_2 0,1 mM, thiamine 1 mM) contenant 0,2% de glycérol et l'apport en antibiotique nécessaire pour stopper la croissance des cellules qui ont perdu le plasmide. Le 20 développement des bactéries est poursuivi à 37°C sous agitation vigoureuse jusqu'à la phase de développement mi-exponentielle, de préférence jusqu'à lecture d'une densité optique de 0,3 à 600 nm.

Après induction de ce gène chimère par l'inducteur 25 IPTG et addition de FeSO_4 à 1 mg/l, la culture est entretenue à 25°C sous agitation vigoureuse pendant 3 heures. Les cellules sont ensuite recueillies par centrifugation à 4°C, lavées avec du MgCl_2 10 mM, du saccharose 0,75 M, du Tris-HCl 20 mM, à pH 7,5, et de nouveau centrifugées. Les cellules sont ensuite mises en suspension dans du saccharose 0,75 M, du Tris-HCl 20 mM, à 30 pH 7,5, et lysées par addition de lysozyme (0,2 mg/ml) et de EDTA (25 mM) à 30°C pendant 30 minutes, puis soumises à un choc osmotique par addition de deux volumes d'eau, puis 35 traitées aux ultrasons à 0°C. Une centrifugation standard dans une centrifugeuse à vitesse lente permet d'éliminer

les cellules non lysées et les débris. Une centrifugation à grande vitesse (par exemple dans un rotor 50Ti de Beckman à 40 000 tours / min) à 4°C conduit à l'obtention d'une membrane qui est mise en suspension dans du 5 saccharose 0,75 M, Tris-HCl 20 mM, à pH 7,5, et maintenue à 4°C.

Pour tester l'activité enzymatique de l'OTBC, la consommation d'oxygène par les membranes résultantes est mesurée à l'aide d'une électrode à oxygène standard et est 10 exprimée en nmoles d' O_2 consommé par minute et par gramme de protéine.

Comme le montre la Figure 4, l'addition de NADH provoque la consommation d'oxygène à la fois dans la membrane témoin (transformée par le vecteur de clonage) et 15 dans la membrane contenant l'OTBC. Cette consommation d'oxygène augmente lorsque l'on ajoute de la plastoquinone 0,2 mM. L'addition de KCN inhibe fortement la consommation d'oxygène dans les membranes témoins. Dans les membranes contenant l'OTBC, on observe une consommation d'oxygène 20 résistant au cyanure élevée. Ceci reflète l'activité oxydoréductase plastoquinol : oxygène de l'OTBC, laquelle activité peut être inhibée par addition de gallate de n-propyle (nPG) 0,5 mM. L'addition de nPG (0,5 mM) à la membrane témoin avant le KCN ne produit pas d'effet 25 indiquant que le composé n'interfère pas avec le flux normal d'électrons dans les membranes de *E.coli* (Figure 4).

Ce test peut être utilisé pour étudier le pouvoir inhibiteur d'un composé sur l'activité de l'OTBC. Ainsi un 30 inhibiteur peut être contrôlé quand il n'a pas d'effet sur la chaîne respiratoire endogène de *E.coli*, en particulier sur le complexe I de la chaîne qui oxyde NADH. Néanmoins, si tel est le cas, NADH peut être substitué par le succinate en tant que donneur d'électrons sans passer par 35 le complexe I. Tout inhibiteur de l'activité de l'OTBC peut être testé sur des plants appropriés, par arrosage du

sol, addition d'un milieu de culture et dépôt direct sur les feuilles, vis-à-vis de l'inhibition de la biosynthèse des caroténoïdes entraînant un blanchiment et alors trouver une application comme herbicide.

5 L'essai décrit peut être modifié pour réaliser un criblage à grande échelle d'inhibiteurs de l'activité de l'OTBC, et leur application en tant qu'herbicide. Dans ce cas, la mesure de la consommation d'oxygène à l'aide d'une électrode à oxygène sera de préférence remplacée par une
10 autre méthode de mesure.

L'activité oxydase de l'OTBC peut être déterminée en mesurant la consommation de NADH au cours de la réaction, par exemple, par spectrophotométrie, en mesurant l'absorbance à 340 nm. La consommation de NADH et la
15 production de NAD au cours de l'essai doit entraîner une diminution de l'absorbance à 340 nm. Alternativement, on peut utiliser toute coloration spécifique de NAD ou de NADH pour contrôler les changements de NAD ou de NADH pendant l'essai.

20 Si l'on utilise le succinate comme donneur d'électrons, dans l'essai, l'activité respiratoire des membranes bactériennes conduira à l'oxydation du succinate en fumarate. Alors l'activité de l'OTBC pourra être suivie en présence de KCN, en mesurant les concentrations en
25 succinate et fumarate qui évoluent au cours de l'essai.

Selon une autre possibilité, on peut utiliser un donneur d'électrons artificiel. Le Phéazine Méto-sulfate (PMS) en est un exemple. Il peut être oxydé par la succinate déshydrogénase des membranes bactériennes ; il
30 est incolore à l'état réduit et est coloré en jaune à l'état oxydé.

Des échantillons de membrane bactérienne contenant l'OTBC vont oxyder le PMS en présence de KCN. Un inhibiteur de l'activité de l'OTBC empêchera l'apparition
35 de la couleur jaune due à l'oxydation du PMS. Ce test de mise en oeuvre simple peut être conduit dans des boîtes

multi-puits permettant de réaliser un dépistage en masse de molécules capables d'inhiber l'activité de l'OTBC.

REVENDICATIONS

1. Séquence d'ADN, comprenant au moins une région codante constituée par:

- la séquence nucléotidique représentée par
5 SEQ ID NO: 1, transcrivant un ARNm, cet ARNm codant pour l'enzyme Oxydase Terminale associée à la Biosynthèse des Caroténoïdes (OTBC) décrite par SEQ ID NO:2,

- la séquence nucléotidique modifiée de la séquence SEQ ID NO:1, telle que décrite ci-dessus,
10 particulièrement par mutation et/ou addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou de plusieurs nucléotide(s), cette séquence modifiée transcrivant un ARNm lui-même codant pour l'OTBC décrite par SEQ ID NO:2, ou codant pour une protéine modifiée de ladite OTBC,
15 ladite protéine modifiée ayant une activité enzymatique équivalente à celle de l'OTBC décrite par SEQ ID NO:2.

2. Séquence d'ADN comprenant au moins une région codante constituée par:

- la séquence nucléotidique complémentaire de
20 celle représentée par SEQ ID NO:1, cette séquence transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'hybrider avec l'ARNm codé par la séquence SEQ ID NO: 1,

- la séquence nucléotidique modifiée de la séquence décrite ci-dessus, par mutation et/ou addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotide(s), cette séquence modifiée transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'hybrider avec un ARNm mentionné ci-dessus,

- un fragment de l'une des séquences
30 nucléotidiques mentionnées ci-dessus, ledit fragment transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'apparier avec l'ARNm codé par la séquence complémentaire de SEQ ID NO:1.

3. ARNm transcrit à partir de la séquence d'ADN selon la revendication 1, et plus particulièrement
35 transcrit à partir de la séquence d'ADN complémentaire représentée par SEQ ID NO:1, ledit ARNm codant pour

l'enzyme OTBC décrite par SEQ ID NO:2, ou pour un fragment ou une protéine modifiée de l'enzyme, et présentant une activité qui est équivalente à ladite enzyme dans la plante.

5 4. ARNm anti-sens transcrit à partir de la séquence d'ADN complémentaire selon la revendication 2, comprenant des nucléotides qui sont complémentaires de la totalité ou d'une partie des nucléotides constituant l'ARNm natif, et capables de s'hybrider avec ledit ARNm.

10 5. Protéine ayant l'activité de l'enzyme OTBC native décrite par SEQ ID NO:2, ou toute protéine modifiée de ladite enzyme OTBC, particulièrement par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ou tout fragment provenant de l'enzyme OTBC ou 15 d'une séquence modifiée de l'enzyme, ladite protéine modifiée ou fragment présentant une activité enzymatique équivalente à celle de l'enzyme OTBC.

20 6. Complexe formé entre un ARNm anti-sens selon la revendication 4, et un ARNm codant pour une enzyme OTBC dans la plante.

25 7. ADN recombiné caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'ADN selon la revendication 1, ladite séquence étant insérée dans une séquence hétérologue, lesdites séquences transcrivant tout ou partie d'une séquence ARNm codant pour tout ou partie de l'enzyme OTBC, cette dernière ayant une activité enzymatique équivalente à l'enzyme OTBC de la plante.

30 8. ADN recombiné caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence d'ADN selon la revendication 2, ladite séquence étant insérée dans une séquence hétérologue, lesdites séquences transcrivant tout ou partie d'une séquence ARNm anti-sens capable de s'apparier avec un ARNm codant pour une enzyme OTBC dans la plante.

35 9. ADN recombiné selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments nécessaires pour contrôler l'expression de la séquence nucléotidique

insérée, particulièrement une séquence promotrice et une séquence de terminaison de transcription.

10. Vecteur de transformation de plantes, adapté pour augmenter la biosynthèse des caroténoïdes, comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID NO:1 selon la revendication 1, codant pour tout ou partie d'une enzyme impliquée dans la synthèse des caroténoïdes, décrite par SEQ ID NO:2, précédé par une origine de réPLICATION de la transcription des plantes, de manière à ce que le vecteur puisse générer de l'ARNm dans les cellules des plantes.

11. Vecteur de transformation de plantes, adapté pour diminuer ou arrêter la biosynthèse des caroténoïdes, comprenant tout ou partie du brin de la séquence nucléotidique complémentaire de SEQ ID NO:1 selon la revendication 2, précédé par une origine de réPLICATION de la transcription des plantes, de manière à ce que le brin complémentaire transcrit puisse s'apparier à l'ARNm codant pour l'enzyme OTBC de la plante impliquée dans la synthèse des caroténoïdes.

12. Cellule de plante transformée par un vecteur selon la revendication 10 ou 11.

13. Plante, ou fragment de plante, particulièrement fruit, graine, pétale, feuille, comprenant des cellules selon la revendication 12.

14. Procédé pour modifier la production de caroténoïdes dans une plante, soit en augmentant la production de caroténoïdes, soit en abaissant ou inhibant la production de caroténoïdes par la plante, relativement au contenu normal de caroténoïdes produits par la plante, ledit procédé comprenant la transformation de cellules desdites plantes à transformer avec un vecteur selon la revendication 10 ou 11.

15. Procédé pour produire des caroténoïdes dans une cellule de plante, ou eucaryote ou procaryote, ledit procédé comprenant la transformation de cellules desdites

plantes, des cellules eucaryotes ou procaryotes à transformer avec un vecteur selon la revendication 10.

16. Procédé pour la sélection de composé présentant un caractère herbicide, selon lequel on met en contact ledit agent avec des cellules ou des membranes de cellules de la revendication 12, et on observe une diminution de la consommation d'oxygène par les membranes desdites cellules, liée à l'inhibition de l'oxydase terminale associée à la biosynthèse des caroténoïdes.

FIG 1

1 CCG CTC ACA TTG GGA TTC GTC ATT CTT CTT CTA AAA CCC GCA AAA TTT CTC CAT TTC TAC
 61 CAA AAA TAT CCA ACT TTT ACT TTT CTT TCC TGT GAA ATT ATC TGC TCA AAT CTT TGG TTC
 121 CTG ACG GAG ATG GCG GCG ATT TCA GCC ATC TCC TCT GGT ACG TGT ACG ATT TCA CGG CCT
M A A I S G I S S G T L T I S R P
 181 TTG GTT ACT CTT CGA CGC TCT AGA GCC GCC GTT TCG TAC AGC TCC TCT CAC CGA TTG CTT
L V T L R R S R A A V S Y S S S H R L L
 241 CAT CAT CTT CCT CTC TCT TCT CGT CGT CTG CTA TTA AGG AAC AAT CAT CGA GTC CAA GCA
H H L P L S S R R L L R N N H R V O * A
 301 ACG ATT TTG CAA GAC GAT GAA GAG AAA GTG GTG GTG GAG GAA TCG TTT AAA GCC GAG ACT
 T I L Q D D E E K V V V E E S F K A E T
 361 TCT ACT GGT ACA GAA CCA CTT GAG GAG CCA AAT ATG AGT TCT TCT TCA ACT AGT GCT TTT
 S T G T E P L E E P N M S S S S T S A F
 421 GAG ACA TGG ATC ATC AAG CTT GAG CAA GGA GTG AAT GTT TTC CTT ACA GAC TCG GTT ATT
 E T W I I K L E Q G V N V F L T D S V I
 481 AAG ATA CTT GAC ACT TTG TAT CGT GAC CGA ACA TAT GCA AGG TTC TTT GTT CTT GAG ACA
 K I L D T L Y R D R T Y A R F F V L E T
 541 ATT GCT AGA GTG CCT TAT TTT GCG TTT ATG TCT GTG CTA CAT ATG TAT GAG ACC TTT GGT
 I A R V P Y F A F M S V L H M Y E T F G
 601 TGG TGG AGG AGA GCA GAT TAT TTG AAA GTA CAC TTT GCT GAG AGC TGG AAT GAA ATG CAT
 W W R R A D Y L K V H F A E S W N E M H
 661 CAC TTG CTC ATA ATG GAA GAA TTG GGT GGA AAT TCT TGG TGG TTT GAT CGT TTT CTG GCT
 H L L I M E E L G G N S W W F D R F L A
 721 CAG CAC ATA GCA ACC TTC TAC TAC ATG ACA GTG TTC TTG TAT ATC TTA AGC CCT AGA
 Q H I A T F Y Y F M T V F L Y I L S P R
 781 ATG GCA TAT CAC TTT TCG GAA TGT GTG GAG AGT CAT GCA TAT GAG ACT TAT GAT AAA TTT
 M A Y H F S E C V E S H A Y E T Y D K F
 841 CTC AAG GCC AGT GGA GAG GAG TTG AAG AAT ATG CCT GCA CCG GAT ATC GCA GTA AAA TAC
 L K A S G E E L K N M P A P D I A V K Y
 901 TAT ACG GGA GGT GAC TTG TAC TTA TTT GAT GAG TTC CAA ACA TCA AGA ACT CCC AAT ACT
 Y T G G D L Y L F D E F Q T S R T P N T
 961 CGA AGA CCA GCA ATA GAA AAT CTA TAC GAT GTG TTT GTG AAC ATA AGA GAT GAT GAA GCA
 R R P V I E N L Y D V F V N I R D D E A
 1021 GAA CAC TGC AAG ACA ATG AGA GCT TGT CAG ACT CTA GGC ACT CTG CGT TCT CCA CAC TCC
 E H C K T M R A C Q T L G S L R S P H S
 1081 ATT TTA GAT GAT GAT ACT GAA GAA GAA TCA GGG TGT GTT GTT CCT GAG GAG GCT CAT
 I L D D D D T E E E S G C V V P E E A H
 1141 TGC GAA GGT ATT GTA GAC TGC CTC AAG AAA TCC ATT ACA AGT TAA TAA ATT AGA AAG TAA
 C E G I V D C L K K S I T S
 1201 ACT AAA AAA GAT TAT TTG TAT CAG CTC ATG AAC AAT AGA TAT AAT CCC ATA TAC TTG GGA
 1261 ATA AAG GAA TAA TGT GAA ATT CCC ATC GTT GTG CTA GTG TGT GAG AGA ATC AAA TAC CCT
 1321 AAT GAT GTA AAT GTA CTT TGA TGA GCT TAA GTC GTT GTA GAC CAT TTT ATC AAA AAA AAA
 1381 AAA AAA AAA AAA AAA A



FIG 2

2/5

IMM : 111 FLTDSVIKILDLYRDRTYA-R~~RE~~VLETIARVPIYAEMSVLEHMYETFGWWRRADYLKVHF 169
+ T +++ I L+ R Y R +LET+A VP +LH+ + + + +K

AOX : 136 YRTVKLLRIPTDLFFKRYGCRAMM~~LEMVAAVPGMMGGM~~LHRLRSLRKFQQSGGWIKALL 195

IMM : 170 AESWNEMHLLIMEELGGNSWWFDR~~EE~~AQHIA~~TY~~Y~~EM~~T~~VE~~IN~~TH~~ISPRMAYHFSECVES~~H~~ 229
E+ NE HL+ M EL W++R L + ++ LYILSP+ +A+ + E
AOX : 196 EEAENERMHLMTMVEL-VKPKWYER~~EL~~AVQ~~C~~VEENAF~~Y~~ESPKVAHRTIVGYL~~EE~~E 254

IMM : 230 AYETYDKFLK-ASGEELKNMPAPDIAVKYYTGGDLYLFDEFQTSRTPNRRPVIE~~N~~YDV 288
A +Y ++LK + +N+PAP IA+ Y+ R P L DV
AOX : 255 AIHSYTYEYLKDLESGAIENV~~PAPAIAIDY~~W-----RLPKDARLKDV 295

IMM : 289 FVNIRDDEAEH 299

IR DEA H
AOX : 296 ITVIRADEAHH 306



FIG 3

T 1 MAISISAMSFGTSVSSYSCFRARSFEKSSVLCNSQNPCRNSVFP. IRKSDGASRCCSVSR
 P 1 MAISISAMSFRTSVSS.....SY..SAFLCNSKNPFCLNSLFS.LRNSHRTFQPSLSR
 A 1 MA.AISGISSGTLTIS.....RPLVTLRRSRAAVSYSSSHRLLLHPLSSRLLL
 consensus

1 MA	ISamS	T	S	L	S	S	lr	1 R
------	-------	---	---	---	---	---	----	-----

T 60 KSCRVRATLLQENEVEVVEKSFAPKSFPDNVGGSNGKPPDDSSS.NGLEKWVIKLEQS
 P 51 KSSRVATLLKENEEEVVVEKSFAPKSFPGNVGNNGEPPDNSSS.NGLEKWVIKIEQS
 A 51 NNHRVQATILQDDEEKVVVEESFKAE...TSTGTEPLEEPNMSSSTS AFETWIICKLEQG
 consensus

61	RV AT1L	e	EE	VVVE	SF	G	P	SSS	g	E	WvIKiEQ
----	---------	---	----	------	----	---	---	-----	---	---	---------

T 119 VNILLTDSEVIKILDLYHNRYARFFVLETIARVPYFAFISVLHMYEFGWWRRADYMKV
 P 110 VNIFLTDSVIKILDLYHDRHYARFFVLETIARVPYFAFISVLHLYEFGWWRRADYLKV
 A 108 VNVFLTDSEVIKILDLYRDRTYARFFVLETIARVPYFAFMSVLHMYETFGWWRRADYLKV
 consensus

121 VNI LTDSVIKILDLYh R YARFFVLETIARVPYFAFISVLHLYEFGWWRRADYLKV

T 179 HFAESWNEMHLLIMEELGGNAWWFDRFLAQHIAIFYYFMTVLMYALSPRMAYHFSECVE
 P 170 HFAESWNEMHLLIMEELGGNAWWFDRFLAQHIAVFYYFMTVSMYALSPRMAYHFSECVE
 A 168 HFAESWNEMHLLIMEELGGNSWWFDRFLAQHIATFYYFMTVFLYILSPRMAYHFSECVE
 Consensus

181 HFAESWNEMHLLIMEELGGN WWFDRFLAQHIA FYYFMTV mY LSPRMAYHFSECVE

T 239 SHAYETYDKFIKDQGEELKNLPAPKIAVDYYTGGDLYLFDEFQTSREPNTRRPKIDNLYD
 P 230 HHAYETYDKFIKDQEAELKKLPAPKIAVSYYTGGDLYLFDEFQTSREPNTRRPKIDNLYD
 A 227 SHAYETYDKFLKASGEELKNMPAPDIAVKYYTGGDLYLFDEFQTSRTPNTRRPVIENLYD
 Consensus

241 HAYETYDKFIK ELK 1PAP IAV YYTGGDLYLFDEFQTSR PNTRRP IdNLYD

T 299 VFMNIRDDEAEHCKTMKACQTHGSLRSPHTD.PCDDSEDDTGCSVP.QADCIGIVDCIKK
 P 290 VFMNIRDDEAEHCKTMKACQTHGSLRSPHTN.PCDESEDDPGCSVP.QADCVGIVDCITK
 A 287 VFVNIRDDEAEHCKMRACQTLGSLRSPHSILDDDDTEESGCVVPEEAHCEGIVDCLKK
 Consensus

301 VFmNIRDDEAEHCKTMkACQT GSLRSPht DdsEdd GC VP A C GIVDCi K

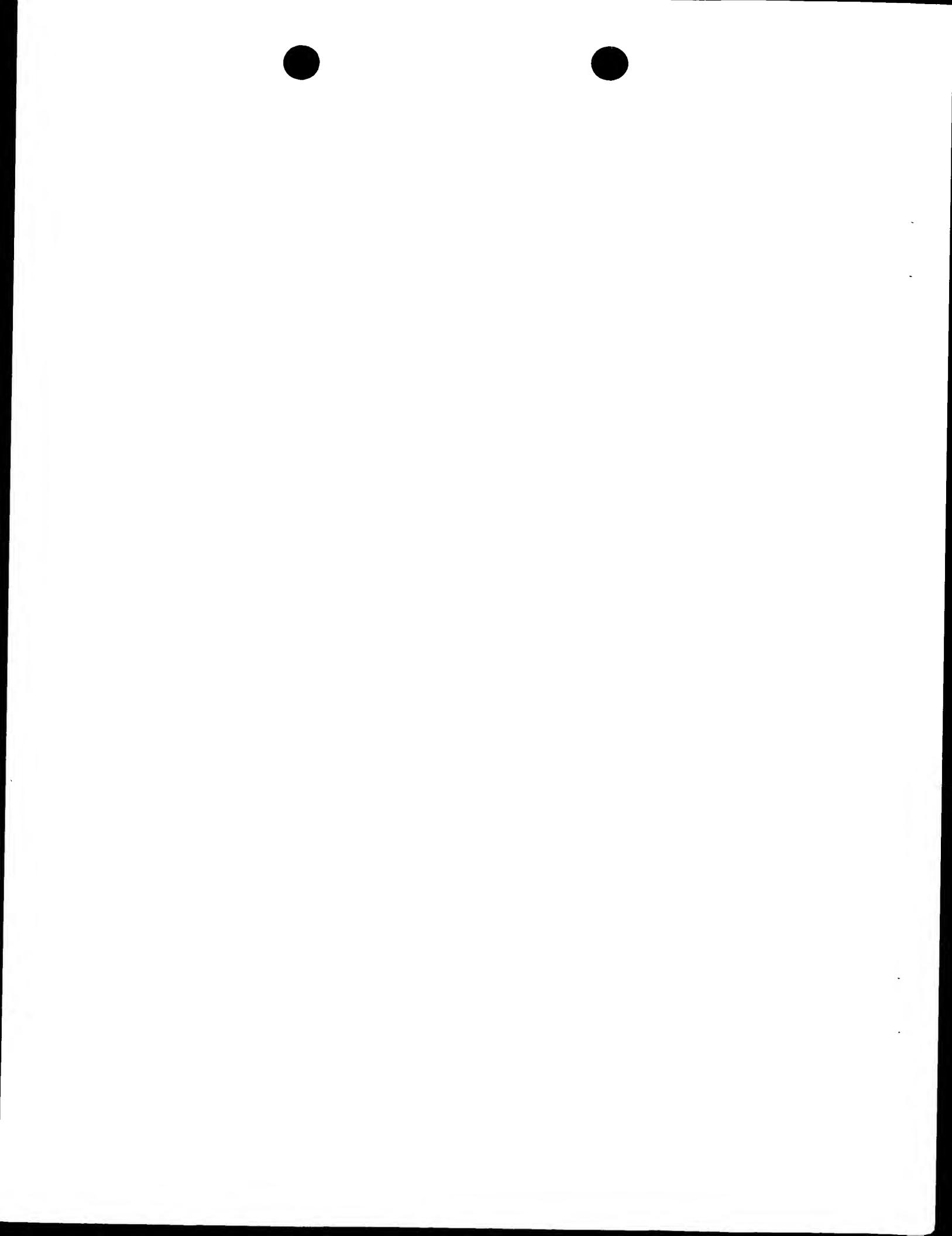


FIG 3 (suite)

T 357 SVTDTQVTKR

P 348 SVADPNVGRR

A 347 SITS.....

Consensus

361 Sv



FIG 4

FIG 4A

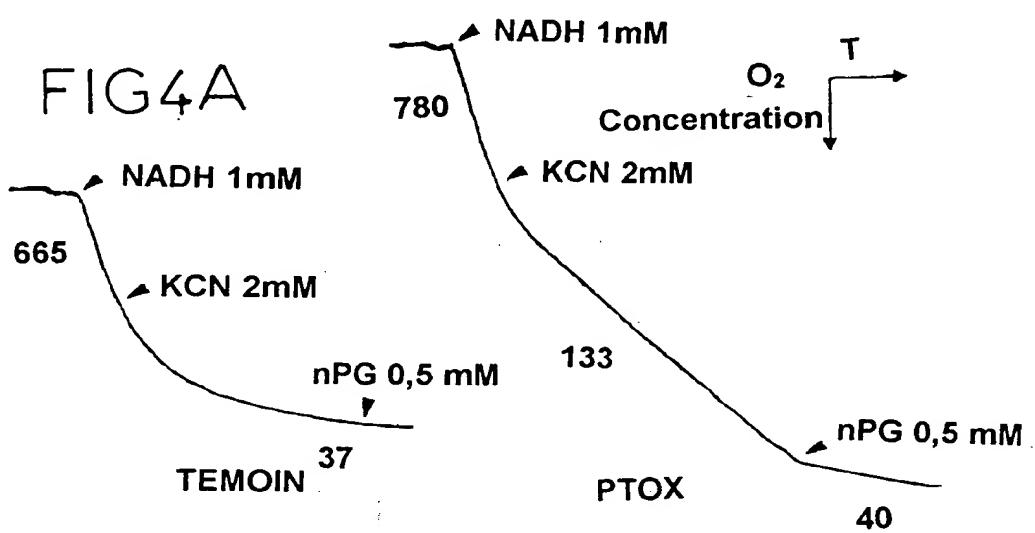
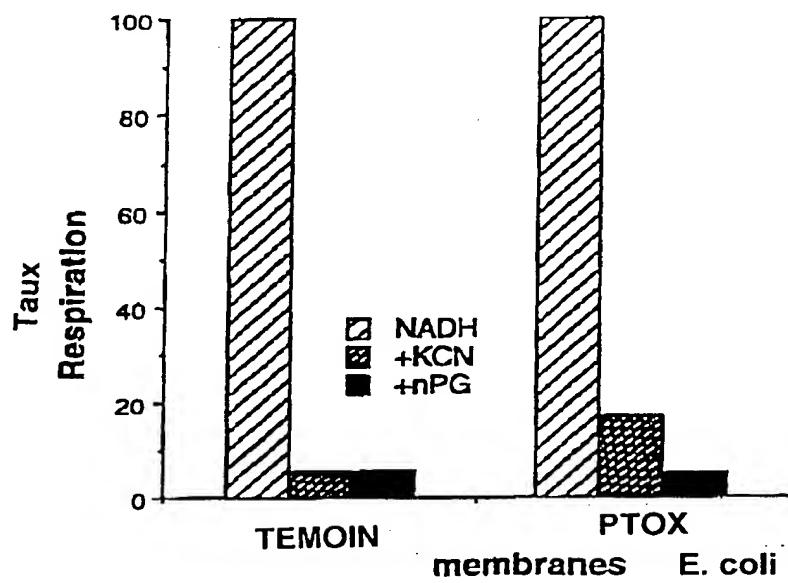


FIG 4B





LISTE DE SEQUENCES

<110> UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

<120> Séquence d'ADNc transcrivant un ARNm codant pour l'oxydase terminale associée à la biosynthèse des caroténoïdes et utilisations

<130> OTBC

<140>

<141>

<150> FR9813283

<151> 1998-10-20

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1396

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

ccgctcacat tgggattcgt cattttctt ctaaaacccg caaaaatttctt ccatttctac 60
caaaaatatac caactttac ttttctttcc tgtgaaatta tctgctcaaa tctttggttc 120
ctgacggaga tggcggcgat ttcaaggcatc tcctctggta cgttgacgat ttcacggcct 180
ttggttactc ttgcacgctc tagagccgcc gtttgcgtaca gctcctctca ccgatttgctt 240
catcatcttc ctctctcttc tcgtcgtctg ctattaagga acaatcatcg agtccaagca 300
acgattttgc aagacgatga agagaaaagtg gtgggtggagg aatcggtttaa agccgagact 360
tctactggta cagaaccact tgaggagcca aatatgagtt cttttcaac tagtgctttt 420
gagacatgga tcatcaagct tgagcaagga gtgaatgttt tccttacaga ctcggttatt 480
aagatacttg acactttgta tcgtgaccga acatatgcaa ggttctttgt tcttgagaca 540
attgcttagag tgccttattt tgcgtttatg tctgtgctac atatgtatga gacctttgggt 600
tggtggagga gagcagattt tttgaaagta cacttgctg agagctggaa tggaaatgcat 660
cacttgctca taatgaaaga attgggtgga aattcttggt ggtttgcgtcg ttttctggct 720
cagcacatag caacccctca ctacttcatg acagtgtct tggatatctt aagccctaga 780
atggcatatc acttttcgga atgtgtggag agtcatgcat atgagactta tgataaattt 840
ctcaaggcca gtggagagga gttgaagaat atgcctgcac cggatatcgc agtaaaatac 900
tatacgggag gtgacttgc ttttgcgtt gaggccaaa catcaagaac tcccaactact 960
cgaagaccag taatgaaaaa tctatacgtat gtgtttgtga acataagaga tgatgaagca 1020
gaacactgca agacaatgag agcttgcgtactcttaggca gtctgcgttc tccacactcc 1080
attttagatg atgatgatac tgaagaagaa tcagggtgtg ttgttcctga ggaggctcat 1140
tgcgaaggta ttgttagactg cctcaagaaa tccattacaa gttataaaat tagaaagtaa 1200
actaaaaaaat attatttgc tcaacttcatg aacaatagat ataatcccat atacttggga 1260
ataaaggaat aatgtgaaat tcccatcgtt gtgctagtgt gtgagagaat caaataccct 1320



aatgatgtaa atgtactttg at gagcttaa gtcgtttag accatttat caaaaaaaaaa 1380
aaaaaaaaaaa aaaaaaa 1396

<210> 2
<211> 351
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2
Met Ala Ala Ile Ser Gly Ile Ser Ser Gly Thr Leu Thr Ile Ser Arg
1 5 10 15

Pro Leu Val Thr Leu Arg Arg Ser Arg Ala Ala Val Ser Tyr Ser Ser
20 25 30

Ser His Arg Leu Leu His His Leu Pro Leu Ser Ser Arg Arg Leu Leu
35 40 45

Leu Arg Asn Asn His Arg Val Gln Ala Thr Ile Leu Gln Asp Asp Glu
50 55 60

Glu Lys Val Val Val Glu Glu Ser Phe Lys Ala Glu Thr Ser Thr Gly
65 70 75 80

Thr Glu Pro Leu Glu Glu Pro Asn Met Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ala
85 90 95

Phe Glu Thr Trp Ile Ile Lys Leu Glu Gln Gly Val Asn Val Phe Leu
100 105 110

Thr Asp Ser Val Ile Lys Ile Leu Asp Thr Leu Tyr Arg Asp Arg Thr
115 120 125

Tyr Ala Arg Phe Phe Val Leu Glu Thr Ile Ala Arg Val Pro Tyr Phe
130 135 140

Ala Phe Met Ser Val Leu His Met Tyr Glu Thr Phe Gly Trp Trp Arg
145 150 155 160

Arg Ala Asp Tyr Leu Lys Val His Phe Ala Glu Ser Trp Asn Glu Met
165 170 175

His His Leu Leu Ile Met Glu Glu Leu Gly Gly Asn Ser Trp Trp Phe
180 185 190

Asp Arg Phe Leu Ala Gln His Ile Ala Thr Phe Tyr Tyr Phe Met Thr
195 200 205



Val Phe Leu Tyr Ile Leu Ser Pro Arg Met Ala Tyr His Phe Ser Glu
210 215 220

Cys Val Glu Ser His Ala Tyr Glu Thr Tyr Asp Lys Phe Leu Lys Ala
225 230 235 240

Ser Gly Glu Glu Leu Lys Asn Met Pro Ala Pro Asp Ile Ala Val Lys
245 250 255

Tyr Tyr Thr Gly Gly Asp Leu Tyr Leu Phe Asp Glu Phe Gln Thr Ser
260 265 270

Arg Thr Pro Asn Thr Arg Arg Pro Val Ile Glu Asn Leu Tyr Asp Val
275 280 285

Phe Val Asn Ile Arg Asp Asp Glu Ala Glu His Cys Lys Thr Met Arg
290 295 300

Ala Cys Gln Thr Leu Gly Ser Leu Arg Ser Pro His Ser Ile Leu Asp
305 310 315 320

Asp Asp Asp Thr Glu Glu Glu Ser Gly Cys Val Val Pro Glu Glu Ala
325 330 335

His Cys Glu Gly Ile Val Asp Cys Leu Lys Lys Ser Ile Thr Ser
340 345 350

<210> 3
<211> 1387
<212> ADN
<213> poivron

<400> 3
ccacgcgtcc gataaaaaaa tcaagaatgg cgatttccat atctgctatg agttttcgaa 60
cttcagttc ttcttcatat tcagcattt tgtcaattc caagaaccca ttttgttga 120
attctctatt ttcacttagg aattctcata gaactttca gccttcgtta tcaaggaaat 180
caagtagagt tcgagcaacg ttgttaaaag agaatgaaga agaagtgggtt gtggagaaaat 240
ctttgcacc taagagttt cctggtaatg tgggaggggg aaataatggg gagccacccg 300
ataattcattc ctcgaacggt ctggagaaat gggttataaa gattgagcag tctgtaaata 360
tctttctcac ggattcagtg ataaagatc ttgacacttt gtatcacgac cgacactatg 420
cgaggtttt cgttctggaa acaattgcaa gagttcccta ttttgcattt atatctgttc 480
ttcacttgcgta cgagagctt ggttgggtgga gacgagcaga ttatctgaag gtgcattttg 540
ccgagagctg gaatgagatg caccattac tcattatgga ggaatttaggt gggaaatgctt 600
ggtggttga ccgattccctt ggcacaacata ttgctgtatt ctattatttc atgacagtct 660
cgatgtatgc tttgagcccg agaatggcat atcatttctc tgaatgtgtg gagcaccatg 720



catacgagac ttacgataaa ttcataagg atcaagaagc ggaattgaag aaattgcccc 780
 ctccaaagat tgcagtggc tactacaccg gaggtgactt gtatttgtc gatgagttc 840
 aaacatcacg agagcctaactcgaaggc caaaaataga taatctgtac gacgtattca 900
 tgaacatca gatgacgaa gcagagcatt gtaagacaat gaaagcgtgt caaacccatg 960
 ggagcctccg ctcccctcac acaaattccat gcgtgagtc tgaagacgat ccaggttgtt 1020
 cagtgcctca ggccgattgt gtaggtatcg tggattgtat aacgaaatct gtcgctgatc 1080
 ctaacgtcg cagaaggtag ggaaaggaaa aacgcagaac gaaactatac atgtatatac 1140
 cagtacagcc aaatatacaa gaaatataca tacatattgt atctttact ctctgaggaa 1200
 gagcttgtca aattgccaa aaaatggta ggcacttggt tttgtttca cctttcaata 1260
 atttgtacta aactatgaac aaatttgctc cggcacacta caactccata ggggtcctgt 1320
 tacgcttctg aactaaattt taacatattt ttgtcaacct tctcagcaaa aaaaaaaaaa 1380
 aaaaaaaaaa 1387

<210> 4
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> poivron

<400> 4
 Met Ala Ile Ser Ile Ser Ala Met Ser Phe Arg Thr Ser Val Ser Ser
 1 5 10 15

Ser Tyr Ser Ala Phe Leu Cys Asn Ser Lys Asn Pro Phe Cys Leu Asn
 20 25 30

Ser Leu Phe Ser Leu Arg Asn Ser His Arg Thr Phe Gln Pro Ser Leu
 35 40 45

Ser Arg Lys Ser Ser Arg Val Arg Ala Thr Leu Leu Lys Glu Asn Glu
 50 55 60

Glu Glu Val Val Val Glu Lys Ser Phe Ala Pro Lys Ser Phe Pro Gly
 65 70 75 80

Asn Val Gly Gly Asn Asn Gly Glu Pro Pro Asp Asn Ser Ser Ser
 85 90 95

Asn Gly Leu Glu Lys Trp Val Ile Lys Ile Glu Gln Ser Val Asn Ile
 100 105 110

Phe Leu Thr Asp Ser Val Ile Lys Ile Leu Asp Thr Leu Tyr His Asp
 115 120 125

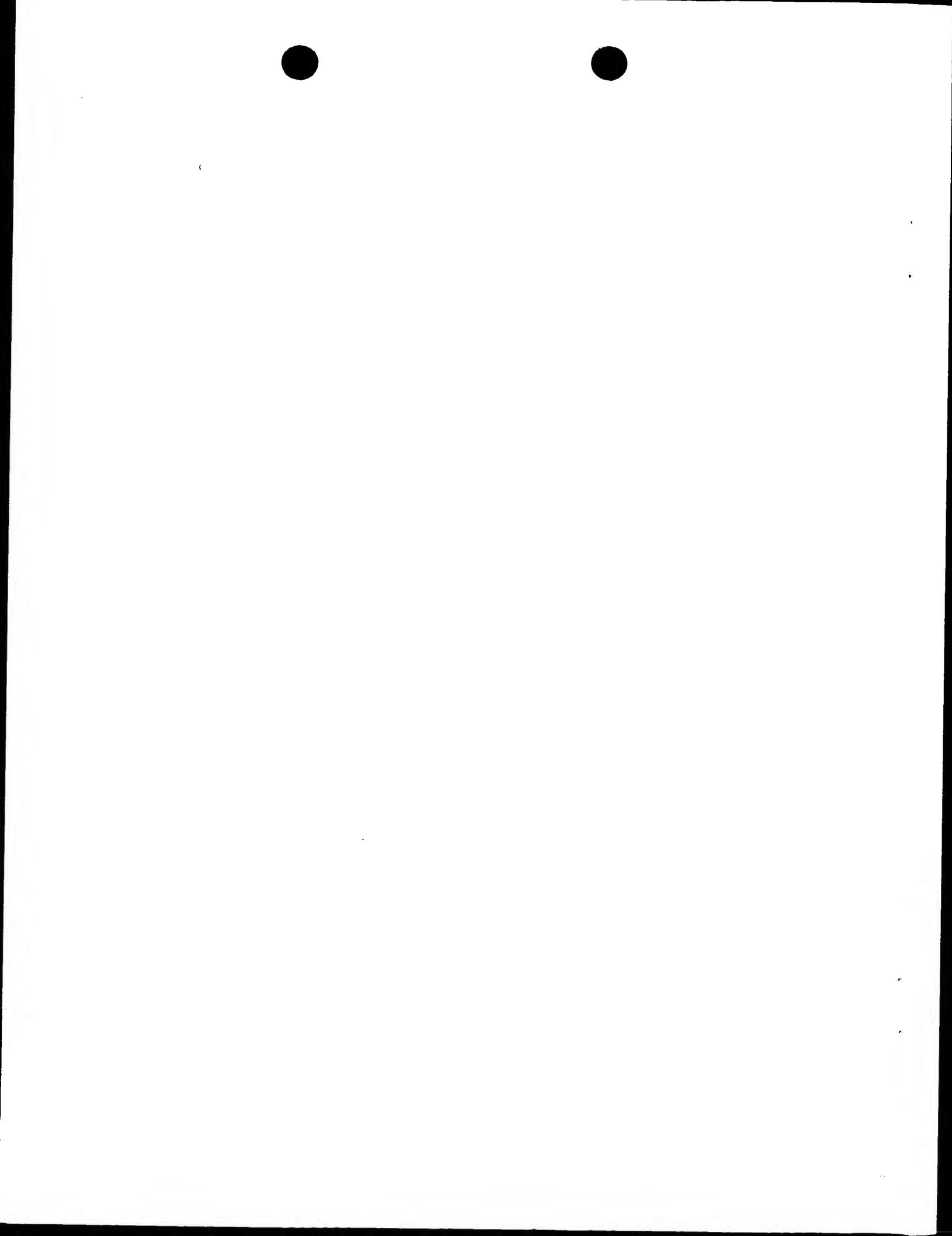
Arg His Tyr Ala Arg Phe Phe Val Leu Glu Thr Ile Ala Arg Val Pro
 130 135 140

Tyr Phe Ala Phe Ile Ser Val Leu His Leu Tyr Glu Ser Phe Gly Trp



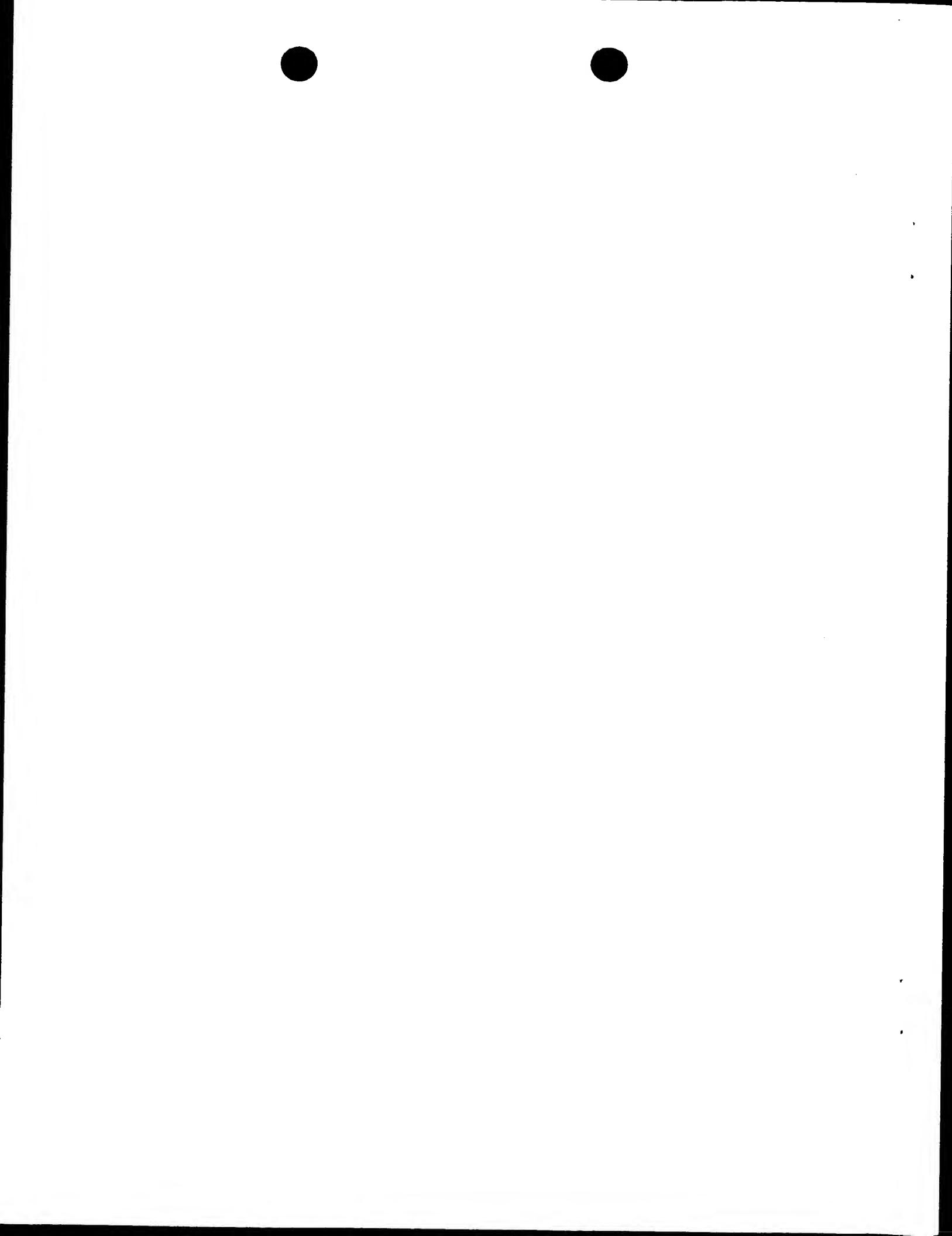
145	150	155	160
Trp Arg Arg Ala Asp Tyr Leu Lys Val His Phe Ala Glu Ser Trp Asn			
165	170	175	
Glu Met His His Leu Leu Ile Met Glu Glu Leu Gly Gly Asn Ala Trp			
180	185	190	
Trp Phe Asp Arg Phe Leu Ala Gln His Ile Ala Val Phe Tyr Tyr Phe			
195	200	205	
Met Thr Val Ser Met Tyr Ala Leu Ser Pro Arg Met Ala Tyr His Phe			
210	215	220	
Ser Glu Cys Val Glu His His Ala Tyr Glu Thr Tyr Asp Lys Phe Ile			
225	230	235	240
Lys Asp Gln Glu Ala Glu Leu Lys Lys Leu Pro Ala Pro Lys Ile Ala			
245	250	255	
Val Ser Tyr Tyr Thr Gly Gly Asp Leu Tyr Leu Phe Asp Glu Phe Gln			
260	265	270	
Thr Ser Arg Glu Pro Asn Thr Arg Arg Pro Lys Ile Asp Asn Leu Tyr			
275	280	285	
Asp Val Phe Met Asn Ile Arg Asp Asp Glu Ala Glu His Cys Lys Thr			
290	295	300	
Met Lys Ala Cys Gln Thr His Gly Ser Leu Arg Ser Pro His Thr Asn			
305	310	315	320
Pro Cys Asp Glu Ser Glu Asp Asp Pro Gly Cys Ser Val Pro Gln Ala			
325	330	335	
Asp Cys Val Gly Ile Val Asp Cys Ile Thr Lys Ser Val Ala Asp Pro			
340	345	350	
Asn Val Gly Arg Arg			
355			

<210> 5
<211> 1284
<212> ADN
<213> tomate



<400> 5

gaattcggca cgagcggcac gagcagaaaa ctaacaactt tcccactttg gaattttctt 60
taccttacct aagaaggta ttaatttgat tcttgtggga aggaagaagg atcaagaatg 120
gcgatttcga tttctgctat gagtttggaa acctcagttt cttcatattc ttgttttaga 180
gctaggagtt ttgagaagtc atcagttt tgcaattccc agaaccatg tcggtttaat 240
tctgttttc cgattcggaa atctgatggg gttcacggg gttctgttcc taggaaatca 300
tgttagagttc gagcaacggtt gttacaagag aatgaagaag aagtgggtgt ggagaaatct 360
tttgcaccta agagtttcc tgataaacgtg ggagggggaa gtaatggaa gccaccagat 420
gattcatcct ctaacggct agagaaaatgg gttataaagc ttgagcagtc tgtaaatatc 480
ttactcacgg attcaagtat aaagattttt gacactttgt atcacaacccg aaactatgct 540
agtttttttgg ttctgaaac aattgcaagg gttccttatt ttgcatttat atcggttctt 600
cacatgtatg agagctttgg ctgggtggaga agggcagatt atatgaaagt gcattttgct 660
gaaagctgga atgagatgca ccatttgctc attatggaag aattaggggg aaatgcttgg 720
tggtttgatc gattttttgc acaacatata gctatattct attatttcat gacagtctt 780
atgtatgctt tgagccccgag aatggcatat catttctctg aatgtgtggg gagccatgca 840
tacgagactt acgataaattt catcaaggat caaggagagg aattgaagaa tttgcccgt 900
ccaaagatttgg cagtggacta ctacacgggaa ggtgacttatttatttga tgagtttcaa 960
acttcacgag agcctaatac tcgaagacca aaaatagata atctctatga cgtattcatg 1020
aacatttagag atgacgaagc agacgattgtt aaaaacgtatga aagcctgtca aactcacggg 1080
agccttcgtt ctcccacacac agatccatgc gatgattctg aagatgatac aggggtttcc 1140
gtacctcaag ctgattgtat aggtatcgtg gattgtataa agaagtcagt caccgatact 1200
caagtaacca aaaggtagga aaaggaaaaa cgcggacaaa ctataacttgt atataactgt 1260
atagacaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1284



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/IB 99/01719

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82 C12N9/02 C12N5/10 G01N33/50 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N G01N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WETZEL, C.M., ET AL.: "nuclear-organelle interactions: the immutans variegation mutant of <i>Arabidopsis</i> is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis" <i>THE PLANT JOURNAL</i>, vol. 6, no. 2, 1994, pages 161-175, XP002110646 cited in the application the whole document</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1,3

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

23 February 2000

09/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/IB 99/01719

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NEWMAN, T., ET AL.: "Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous <i>Arabidopsis</i> cDNA clones" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 3 February 1995 (1995-02-03), XP002110647 heidelberg, germany accession no. T42793 ---	1
X	BEVAN, M., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome 4, BAC clone T10I14" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 3 February 1998 (1998-02-03), XP002110648 accession no. AL021712 ---	2,4
A	BEVAN, M., ET AL.: "hypothetical 38.7 KD protein" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 1 June 1998 (1998-06-01), XP002110649 heidelberg, germany accession no. 049631 ---	1-15
A	FINNEGAN, P.M., ET AL.: "untitled" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 15 July 1998 (1998-07-15), XP002110650 heidelberg, germany accession no. 003376 ---	1-15
A	WO 95 34668 A (BIOSOURCE TECH INC) 21 December 1995 (1995-12-21) abstract; pages 3,5,4 the whole document ---	1-15
A	WO 91 09128 A (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 27 June 1991 (1991-06-27) Pages 1,6; examples; revendications ---	1-15
A	FINNEGAN, P.M., ET AL. : "differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 114, no. 2, June 1997 (1997-06), pages 455-466, XP002131002 the whole document ---	1-15
P,X	CAROL, P., ET AL.: "mutations in the <i>Arabidopsis</i> gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with Phytoene desaturation" THE PLANT CELL, vol. 11, January 1999 (1999-01), pages 57-68, XP002110651 the whole document ---	1-3,5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/IB 99/01719

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>WU, D., ET AL.: "THE IMMUTANS VARIEGATION LOCUS OF ARABIDOPSIS DEFINES A MITOCHONDRIAL ALTERNATIVE OXIDASE HOMOLOG THAT FUNCTIONS DURING EARLY CHLOROPLAST BIOGENESIS" THE PLANT CELL, vol. 11, January 1999 (1999-01), pages 43-55, XP002131003 the whole document ----</p>	1-3,5
T	<p>SMITH, H.: "photosynthetic pigmentation - variegations on a theme" THE PLANT CELL, vol. 11, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 1-3, XP002131004 the whole document -----</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB 99/01719

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9534668	A 21-12-1995	US 5922602	A	13-07-1999
		AU 710588	B	23-09-1999
		AU 2653495	A	05-01-1996
		CA 2193094	A	21-12-1995
		EP 0804600	A	05-11-1997
		JP 10501968	T	24-02-1998
		ZA 9504451	A	05-02-1996
WO 9109128	A 27-06-1991	AU 645534	B	20-01-1994
		AU 6893891	A	18-07-1991
		CA 2070831	A	14-06-1991
		EP 0505405	A	30-09-1992
		EP 0699765	A	06-03-1996
		JP 5502160	T	22-04-1993
		US 5750865	A	12-05-1998
		US 5304478	A	19-04-1994

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. Internationale No
PCT/IB 99/01719

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N15/82 C12N9/02 C12N5/10 G01N33/50 A01H5/00											
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB											
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N G01N A01H											
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche											
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)											
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Catégorie</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">no. des revendications visées</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> WETZEL, C.M., ET AL.: "nuclear-organelle interactions: the immutans variegation mutant of <i>Arabidopsis</i> is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis" <i>THE PLANT JOURNAL</i>, vol. 6, no. 2, 1994, pages 161-175, XP002110646 cité dans la demande le document en entier --- -/-/ </td> <td style="padding: 2px; text-align: center;">1,3</td> </tr> </tbody> </table>						Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées	X	WETZEL, C.M., ET AL.: "nuclear-organelle interactions: the immutans variegation mutant of <i>Arabidopsis</i> is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis" <i>THE PLANT JOURNAL</i> , vol. 6, no. 2, 1994, pages 161-175, XP002110646 cité dans la demande le document en entier --- -/-/	1,3
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées									
X	WETZEL, C.M., ET AL.: "nuclear-organelle interactions: the immutans variegation mutant of <i>Arabidopsis</i> is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis" <i>THE PLANT JOURNAL</i> , vol. 6, no. 2, 1994, pages 161-175, XP002110646 cité dans la demande le document en entier --- -/-/	1,3									
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents			<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe								
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée											
"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets											
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 23 février 2000			Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 09/03/2000								
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Fonctionnaire autorisé Holtorf, S								

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Int. Je Internationale No

PCT/IB 99/01719

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	NEWMAN, T., ET AL.: "Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous <i>Arabidopsis</i> cDNA clones" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 3 février 1995 (1995-02-03), XP002110647 heidelberg, germany accession no. T42793 ---	1
X	BEVAN, M., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome 4, BAC clone T10I14" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 3 février 1998 (1998-02-03), XP002110648 accession no. AL021712 ---	2, 4
A	BEVAN, M., ET AL.: "hypothetical 38.7 KD protein" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 1 juin 1998 (1998-06-01), XP002110649 heidelberg, germany accession no. 049631 ---	1-15
A	FINNEGAN, P.M., ET AL.: "untitled" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 15 juillet 1998 (1998-07-15), XP002110650 heidelberg, germany accession no. 003376 ---	1-15
A	WO 95 34668 A (BIOSOURCE TECH INC) 21 décembre 1995 (1995-12-21) abstract; pages 3, 5, 4 le document en entier ---	1-15
A	WO 91 09128 A (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 27 juin 1991 (1991-06-27) pages 1, 6; examples; revendications ---	1-15
A	FINNEGAN, P.M., ET AL.: "differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 114, no. 2, juin 1997 (1997-06), pages 455-466, XP002131002 le document en entier ---	1-15
P, X	CAROL, P., ET AL.: "mutations in the <i>Arabidopsis</i> gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with Phytoene desaturation" THE PLANT CELL, vol. 11, janvier 1999 (1999-01), pages 57-68, XP002110651 le document en entier ---	1-3, 5

-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. [REDACTED] Internationale No
PCT/IB 99/01719

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	<p>WU, D., ET AL.: "THE IMMUTANS VARIEGATION LOCUS OF ARABIDOPSIS DEFINES A MITOCHONDRIAL ALTERNATIVE OXIDASE HOMOLOG THAT FUNCTIONS DURING EARLY CHLOROPLAST BIOGENESIS" THE PLANT CELL, vol. 11, janvier 1999 (1999-01), pages 43-55, XP002131003 le document en entier -----</p>	1-3, 5
T	<p>SMITH, H.: "photosynthetic pigmentation - variegations on a theme" THE PLANT CELL, vol. 11, 1 Janvier 1999 (1999-01-01), pages 1-3, XP002131004 le document en entier -----</p>	1-16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

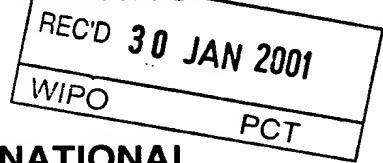
De la Internationale No

PCT/IB 99/01719

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9534668 A	21-12-1995	US 5922602 A AU 710588 B AU 2653495 A CA 2193094 A EP 0804600 A JP 10501968 T ZA 9504451 A	13-07-1999 23-09-1999 05-01-1996 21-12-1995 05-11-1997 24-02-1998 05-02-1996
WO 9109128 A	27-06-1991	AU 645534 B AU 6893891 A CA 2070831 A EP 0505405 A EP 0699765 A JP 5502160 T US 5750865 A US 5304478 A	20-01-1994 18-07-1991 14-06-1991 30-09-1992 06-03-1996 22-04-1993 12-05-1998 19-04-1994

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT



RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire MD/U04B3120	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/IB99/01719	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20/10/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 20/10/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/82		
Déposant UNIVERSITE JOSEPH FOURIER et al.		

<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input checked="" type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 22/05/2000	Date d'achèvement du présent rapport 26.01.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Marinoni, J-C N° de téléphone +49 89 2399 8563





RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/IB99/01719

1. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17).*) :

Description, pages:

1-33 version initiale

Revendications. N°:

1-16 version initiale

Dessins, feuilles:

1/5-5/5 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-6 telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante : , qui est :

- la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
 - la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
 - la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
 - déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.



**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/IB99/01719

- La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listages des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- de la description, pages :
 des revendications, n°s :
 des dessins, feuilles :

5. Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

II. Priorité

1. Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que les documents suivants n'ont pas été remis dans le délai prescrit :
- copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
 traduction de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.

2. Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que la revendication de la priorité a été jugée non valable.

Pour les besoins du présent rapport, la date de dépôt international indiquée plus haut est donc considérée comme la date pertinente.

3. Observations complémentaires, le cas échéant :
voir feuille séparée

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1, 3, 5-16 Non : Revendications 2, 4
Activité inventive	Oui : Revendications 1, 3, 5-16 Non : Revendications 2, 4
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-16 Non : Revendications aucune



**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/IB99/01719

2. Citations et explications
voir feuille séparée



Concernant le point II

Priorité

L'objet de la présente demande relatif à un procédé pour la sélection de composés présentant un caractère herbicide et consistant à mettre en contact des cellules ou des membranes de cellules selon la revendication 12 avec ledit agent (revendication 16) est absent du document de priorité puisqu'il a été introduit pour la première fois à la date de dépôt de la présente demande. La priorité revendiquée n'est donc pas valable pour ledit objet.

Les documents suivants ont été cités en tant que documents P:

PLANT CELL, Vol. 11, janvier 1999, pages 57-68, Carol et al. 'Mutations in the *Arabidopsis* gene *IMMUTANS* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation'

PLANT CELL, Vol. 11, janvier 1999, pages 43-55, Wu et al. 'The *IMMUTANS* variegation locus of *Arabidopsis* defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis'.

Cependant, les documents en question ne décrivent ni suggèrent un tel procédé: ils ne sont donc pas utilisés pour l'établissement de la présente opinion.

Concernant le point V

Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: Newman et al. 'Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones' EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 3 février 1995

D2: Bevan et al. 'Arabidopsis thaliana chromosome 4, BAC clone T10I14' EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 3 février 1998

1. **D1 et D2** décrivent de manière implicite les séquences anti-sens des **revendications 2 et 4**.

En conséquence, l'objet des **revendications 2 et 4** ne satisfait pas les critères de l'Articles 33(2) PCT relatifs à la nouveauté.



2. Les autres revendications satisfont les critères de l'Article 33(2) relatifs à la nouveauté et les critères de l'Article 33(3) relatifs à l'activité inventive.
3. Des doutes peuvent être émis quant à l'utilité (c'est-à-dire les possibilités d'applications industrielles) du complexe de la **revendication 6** (Article 33(4) PCT). En particulier, la contribution dudit complexe à la solution au problème technique sous-jacent dans la présente demande paraît floue (Article 5 PCT) même s'il est évident qu'un tel complexe doit être obtenu *in vivo* entre ARNm natifs et ARN antisens résultant de l'expression d'un acide nucléique exogène afin d'inhiber l'expression de la protéine OTBC. En tout état de cause, rien dans la présente demande ne permet de savoir à quelle fin la production d'un tel complexe serait nécessaire industriellement

